

Université de Montréal

Développement d'une plateforme de criblage par SPR pour la caractérisation d'inhibiteurs de la DHFR R67

par

Sarah Mélissa Jane Abraham

Département de Chimie

Faculté des Arts et des Sciences

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures et postdoctorales
en vue de l'obtention du grade Maître ès sciences (M.Sc.) en Chimie

Avril, 2017

© Sarah Mélissa Jane Abraham, 2017

Université de Montréal
Faculté des études supérieures et postdoctorales

Ce mémoire intitulé :

Développement d'une plateforme de criblage par SPR pour la caractérisation
d'inhibiteurs de la DHFR R67

présenté par :

Sarah Mélissa Jane Abraham

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Andreea R. Schmitzer, présidente-rapporteuse

Joelle N. Pelletier, directrice de recherche

Anne Marinier, membre du jury

Résumé

L'objectif du projet de recherche est de développer une méthode de criblage d'inhibiteurs basée sur une technologie émergente, soit un dispositif portatif utilisant la résonance des plasmons de surface (SPR).

La cible du criblage est la dihydrofolate réductase R67 (DHFR R67), une enzyme qui confère une résistance bactérienne à l'antibiotique triméthoprim. Ici, l'enzyme cible est immobilisée sur une surface d'or mince avec des propriétés plasmoniques (optiques) spécifiques qui varient en fonction de la masse des molécules se liant à cette surface. Cette technique permet de suivre les événements de liaison de molécules à la DHFR R67 immobilisée, et ainsi peut permettre l'identification d'inhibiteurs potentiels. Cependant, la masse molaire des inhibiteurs typiquement utilisés lors de criblages préliminaires (*i.e.* 500-1000 g/mol) est trop faible pour générer un signal SPR détectable. Afin de contrer cette lacune, ce mémoire a pour objet de développer un essai compétitif indirect qui mettra en jeu des molécules de masse supérieure. D'abord, une nanoparticule d'or portant un analogue de substrat se liera à la DHFR R67 immobilisée à la surface d'or, générant ainsi un signal SPR important en raison de la masse molaire élevée de la nanoparticule. Ensuite, lors du criblage d'inhibiteurs potentiels, les nanoparticules liées seront déplacées de l'enzyme cible si la molécule criblée fournit une affinité suffisante. Ainsi, il sera possible de suivre indirectement la liaison d'un inhibiteur à la cible.

Ce projet vise donc à tester et à valider l'approche de criblage SPR appliquée à la DHFR R67.

Mots-clés : Chimie médicinale, enzymologie, développement de plateforme de criblage, résonance des plasmons de surface, dihydrofolate réductase R67, biophysique

Abstract

The objective of the research project is to develop a method for inhibitor screening based on a portable Surface Plasmon Resonance (SPR) device, an emerging technology.

The target is R67 dihydrofolate reductase (R67 DHFR), an enzyme that confers bacterial resistance to the antibiotic trimethoprim. Here, the target enzyme is linked to a thin gold surface having specific plasmonic (optical) properties that vary as a function of the mass of bound molecules. This allows monitoring binding to the surface-linked R67 DHFR, and thus permits identification of inhibitors. However, the mass of the low-affinity inhibitors typically identified in early stages of screening (*i.e.* 500-1000 g/mol) is too low to produce a significant SPR signal. To address this shortcoming, a competitive assay will be developed: a gold nanoparticle carrying a substrate analog will bind the surface-immobilized R67 DHFR, resulting in a strong SPR signal due to its high mass. Then, upon screening for potential inhibitors, the bound nanoparticle will be displaced from the target enzyme if a molecule provides sufficient affinity. By those means, it will be possible to indirectly monitor the binding of an inhibitor to the target.

This goal of this project is to test and validate the SPR screening approach applied to R67 DHFR.

Keywords : Medicinal chemistry, enzymology, screening platform development, surface plasmon resonance, R67 dihydrofolate Reductase, biophysics

Table des matières

Résumé.....	iv
Abstract	v
Table des matières.....	vi
Liste des tableaux.....	viii
Liste des figures	ix
Liste des abréviations.....	xii
Remerciements.....	xiv
Chapitre 1 - Introduction.....	1
1.1. L'émergence de la résistance aux antibiotiques et de l'enzyme DHFR R67	2
1.1.1. La résistance aux antibiotiques	2
1.1.2. Les DHFRs R67, humaine et de <i>E. coli</i>	6
1.2. Les techniques utilisées pour le criblage d'inhibiteurs	13
1.3. La résonance des plasmons de surface (SPR) et les nanoparticules d'or (AuNPs) ..	20
1.3.1. Les principes de la SPR	20
1.3.2. Les principes de la LSPR.....	27
1.3.3. Les caractéristiques des AuNPs	28
1.4. L'objectif du projet de recherche	32
1.5. Références (Chapitre 1)	34
Chapitre 2 - Détermination des conditions de criblage de la DHFR R67 et de la hDHFR	39
2.1. Préface.....	40
2.2. Article	41
2.2.1. SUMMARY	42
2.2.2. INTRODUCTION	43
2.2.3. MATERIALS AND METHODS.....	46
2.2.4. RESULTS AND DISCUSSION	50
2.2.5. CONCLUSIONS.....	63
2.2.6. ACKNOWLEDGEMENTS	64

2.2.7.	SUPPORTING INFORMATION.....	65
2.2.8.	REFERENCES (Chapitre 2).....	68
Chapitre 3 - Développement d'une plateforme de criblage de la DHFR R67 en SPR.....		72
3.1.	Préface.....	73
3.2.	Approche A : Essai compétitif impliquant les FA@AuNPs et la DHFR R67 immobilisée.....	74
3.2.1.	Concept, avantages et inconvénients	74
3.2.2.	Partie expérimentale.....	76
3.2.3.	Résultats et discussion	84
3.2.4.	Conclusion	98
3.3.	Approche B : Essai compétitif impliquant l'FA immobilisé et la DHFR R67	99
3.3.1.	Concept, avantages et inconvénients	99
3.3.2.	Partie expérimentale.....	101
3.3.3.	Résultats et discussion	104
3.3.4.	Conclusion	109
3.4.	Références (Chapitre 3)	109
Chapitre 4 - Conclusion générale et perspectives		112
4.1.	Retour sur les objectifs et résultats du projet.....	113
4.2.	Perspectives.....	115
4.3.	Référence	117
Annexe		i
Section A – Résultats supplémentaires du Chapitre 2		ii
I.	Activity tests of R67 DHFR and hDHFR using PEG as a cosolvent.....	ii
Section B – Analyses de données du Chapitre 3 par Matlab®		iv
I.	Codes utilisés pour la recherche de λ_{SPR} (minpixhuntlr3.m).....	iv
II.	Commandes utilisées pour la recherche de λ_{SPR}	v
Références (Annexe).....		v

Liste des tableaux

En français:

Tableau 1-1 Comparaison des enzymes hDHFR, ecDHFR et DHFR R67.....	7
Tableau 1-2 Résumé des paramètres importants de différentes techniques analytiques biophysiques pour le criblage de fragments.....	16
Tableau 1-3 Résumé des avantages et désavantages relatifs aux différentes techniques analytiques biophysiques concernant le criblage, la validation ainsi que la caractérisation de fragments.....	18

En anglais:

Table 2-1 Protocol table for cosolvent analysis and final choice for early and late stage screening	51
Table 2-2 IC ₅₀ of MTX and PMTX against hDHFR and IC ₅₀ of 1, 2 and PMTX against R67 DHFR in organic cosolvents and IL ^a	56
Table 2-3 Kinetic constants for the reaction of DHF and NADPH by R67 DHFR and hDHFR ^a	60
Table 2-4 T _m (°C) values of R67 DHFR and of hDHFR from thermal scanning fluorimetry shift assays.	61

Liste des figures

Figure 1-1 Réaction de catalyse des DHFRs	6
Figure 1-2 Structure chimiques des différentes molécules pouvant lier le site actif de la hDHFR, ecDHFR ou DHFR R67	9
Figure 1-3 Site actif de la DHFR R67 catalysant la réaction de réduction du DHF en présence de NADPH	10
Figure 1-4 Interactions enzyme-substrats et mécanisme catalytique dans le site actif de la DHFR R67	11
Figure 1-5 Processus de découverte de médicaments	13
Figure 1-6 La polarisation S et P de la lumière définies	21
Figure 1-7 Configurations de Kretschmann en SPR	21
Figure 1-8 Sensogramme typique observé par l'utilisation d'un biosenseur en SPR	24
Figure 1-9 Représentation de la limite de détection en SPR.	24
Figure 1-10 Principe d'un biocapteur SPR	25
Figure 1-11 Réaction chimique impliquée dans un couplage EDC/NSH	26
Figure 1-12 Propriétés physiques et optiques des NPs	27
Figure 1-13 Les différentes morphologies possibles des NPs	29
Figure 1-14 Différentes voies de réactions menant à des formes variées de nanocristaux	30
Figure 1-15 Les deux approches considérées pour le développement d'une plateforme de criblage d'inhibiteurs de la DHFR R67	33
Figure 1-16 Les acteurs impliqués lors des expériences contrôles en LSPR pour l'approche A	33
Figure 2-1 Structures of R67 DHFR and hDHFR inhibitors.	44
Figure 2-2 Initial rate of the enzymatic reaction for (A) R67 DHFR and (B) hDHFR in the presence of increasing concentrations of organic cosolvents	52
Figure 2-3 Initial rate of the enzymatic reaction for R67 DHFR (□) and hDHFR (■) with a water miscible IL as cosolvents	53
Figure 2-4 Initial rate of the enzymatic reaction for R67 DHFR and hDHFR with the water-immiscible IL [BMIm][PF ₆], and expected increase in enzyme activity if reactants and enzyme partition fully into the aqueous phase.	54

Figure 3-1 Configuration du système pour l'approche A	74
Figure 3-2 Structure de l'inhibiteur DHFR34 de la DHFR R67.....	75
Figure 3-3 Résultats attendus pour le criblage par l'approche A.....	76
Figure 3-4 Exemple type de la caractérisation des cit:AuNPs synthétisées.	77
Figure 3-5 Exemple type de la caractérisation des FA:AuNPs suite à 30 min de fonctionnalisation à l'FA	78
Figure 3-6 Installation ouverte utilisée pour des mesures en LSPR	79
Figure 3-7 Effet de l'homogénéisation de l'échantillon lors des cinétiques LSPR	80
Figure 3-8 Effet d'une dilution directe à 10% de DMSO lors de la cinétique LSPR comparée à l'utilisation de solution déjà diluée à 10% DMSO	81
Figure 3-9 Effet de la combinaison des aliquots de FA:AuNPs fonctionnalisés.....	82
Figure 3-10 Montage utilisé pour la caractérisation d'enzyme immobilisées en surface.....	83
Figure 3-11 Assemblage utilisé pour l'immobilisation de la DHFR R67 à une surface d'or...	83
Figure 3-12 Caractérisation de la His-tag DHFR R67 immobilisée pour l'approche A.....	85
Figure 3-13 Essai compétitif en LSPR pour l'approche A impliquant des FA:AuNPs.....	86
Figure 3-14 Vérification des interactions non-spécifiques entre les cit:AuNPs et la DHFR R67	87
Figure 3-15 Vérification des interactions non-spécifiques entre les FA:AuNPs et l'inhibiteur DHFR34.....	88
Figure 3-16 Vérification des interactions non-spécifiques entre les FA:AuNPs et l'inhibiteur MTX.....	88
Figure 3-17 Mécanisme proposé pour expliquer les signaux LSPR observés pendant l'essai compétitif selon l'approche A.....	89
Figure 3-18 Vérification de la possibilité de fonctionnalisation des cit@AuNPs par l'inhibiteur DHFR34 (I ₃₄)	90
Figure 3-19 Amines primaires utilisées pour fonctionnaliser la surface des AuNPs	91
Figure 3-20 Réactions testées pour la fonctionnalisation covalente des AuNPs avec l'FA	92
Figure 3-21 Spectres infrarouges (FTIR) superposés entre le 4-ATP et les 4-ATP@AuNPs..	95
Figure 3-22 Vérification des interactions non-spécifiques entre les FA-AuNPs et l'inhibiteur DHFR34.....	96
Figure 3-23 Essai compétitif en LSPR pour l'approche A impliquant des FA-AuNPs.....	97

Figure 3-24 Deuxième approche (approche B) pour le développement d'un essai de criblage indirect en SPR	99
Figure 3-25 Résultats attendus pour l'approche B.....	100
Figure 3-26 Structures des espaceurs moléculaires utilisés pour fonctionnaliser la surface des prismes d'or	102
Figure 3-27 Compilation des chimies de surface testées dans le but de lier l'FA de façon covalente à la surface du prisme d'or pour l'approche B.	102
Figure 3-28 Appareil portatif P4SPR utilisée pour les mesures en SPR	103
Figure 3-29 Tests SPR en utilisant des FA-(4-ATP)@prismes	104
Figure 3-30 Tests de saturation de la surface des prismes d'or	106
Figure 3-31 Tests SPR en utilisant des mPEG-SH@prismes	107
Figure 3-32 Tests SPR en utilisant des FA-PEG-SH@prismes.....	108

Liste des abréviations

4-ATP : 4-aminothiophénol

AuNP : Nanoparticules d'or

Cit : Citrate

E.coli : *Escherichia coli*

ecDHFR : Dihydrofolate réductase chromosomale d'*E. coli*

DHF : Dihydrofolate

DHFR : Dihydrofolate réductase

DHFR R67 : Dihydrofolate réductase R67

FA : Acide folique

hDHFR : Dihydrofolate réductase humaine

NADPH : Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate

NP : Nanoparticule

MTX : Methotrexate

PEG : Polyéthylène glycol

SAM : Monocouche de surface auto-assemblée

SPR : Résonance des plasmons de surface

THF : Tétrahydrofolate

TMP : Triméthoprim

TP : Tampon

À Papa, Maman, Sam et Isra

Remerciements

J'aimerais d'abord remercier ma directrice de recherche, Prof. Joelle Pelletier, de m'avoir donné l'opportunité de faire une maîtrise dans son laboratoire de recherche. Je la remercie spécialement pour son support continu et pour avoir servi de mentor tout au long de ce projet. J'aimerais remercier Prof. Jean-François Masson pour avoir collaborer par son expertise en SPR et sans qui le projet n'aurait pas été possible. Je remercie Prof. Anne Marinier pour son implication dans la synthèse d'inhibiteurs de la DHFR R67, ainsi que son soutien lors de demandes de bourses.

Un grand merci spécialement à Jacynthe Toulouse, une collègue et confidente exceptionnelle, pour m'avoir introduite au laboratoire, initiée à la cinétique enzymatique qui m'a value un papier en tant que co-auteure et pour m'avoir aidée tout au long de la progression du projet.

J'aimerais remercier également les autres membres du laboratoire qui ont contribué à rendre l'ambiance quotidienne agréable : Dr. Maximilian Ebert, Olivier Rousseau, Lorea Alejaldre-Ripalda, Dr. Sophie Gobeil, Dr. Daniela Quaglia, Natalie Rachel et Dr. David Charbonneau. J'aimerais également remercier Dr. Nathalia Bukar et Dr. Maxime Couture du laboratoire de Prof. Masson pour m'avoir grandement aidée afin de m'initier à la chimie des nanoparticules d'or, la SPR et l'analyse de données par Matlab.

Je voudrais dire merci à mes ami(e)s rencontrés au baccalauréat en chimie qui ont rendu mon expérience universitaire magique tant aux études sous-graduées que graduées : Sam, Gen, Audrey, Éliane, Kev, Alessa et Prettiny. Merci surtout à ma famille (particulièrement mes cousins & cousines) pour vos supports et encouragements constants et à Yvi-chan pour les rires et belles distractions durant ma rédaction de mémoire.

Merci à tous pour votre aide et support. Vraiment, je n'ai pas vu ces deux dernières années passées! C'était une expérience très enrichissante et agréable d'avoir été membre du labo Pelletier. Au plaisir de garder le contact avec chacun d'entre vous par la suite !

Chapitre 1 - Introduction

1.1. L'émergence de la résistance aux antibiotiques et de l'enzyme DHFR R67

1.1.1. La résistance aux antibiotiques

Le combat des maladies et la prolongation de l'espérance de vie sont constamment au cœur des préoccupations humaines. En effet, en 1900, quand la cause principale des décès aux États-Unis était due à la prolifération incontrôlée de bactéries pathogènes, *i.e.* aux infections, l'espérance de vie n'était que de 47 ans en moyenne mondialement (46 ans pour l'homme et 48 ans pour la femme)[1]. Cette situation alarmante stimula grandement la recherche et le développement dans le domaine de la médecine et de ses domaines connexes. Il en résulta que les sulfonamides furent les premiers agents antibactériens utilisés pour combattre et soigner efficacement les infections des victimes de la Première Guerre mondiale de 1914-1918[1]. Considérés comme miraculeux à l'époque, ces dérivés de sulfonamide ont servi de piliers menant à la découverte des premiers antibiotiques, des composés chimiques administrés qui bloquent la croissance bactérienne. Bien que Louis Pasteur fut le premier à démontrer une connexion entre les infections et les bactéries en 1882[2] et qu'il y eut la découverte du premier antibiotique (la pénicilline) par Sir Alexander Fleming en 1929[3], ce n'est seulement qu'au courant des années 1940 que les antibiotiques ont été introduits sur le marché [1].

La découverte de la pénicilline a révolutionné sans précédent la médecine telle qu'on la connaît aujourd'hui. En effet, il est estimé que les antibiotiques ont sauvé la vie de millions de personnes de tous âges pendant plus de 60 ans[1], particulièrement au courant de la Seconde Guerre mondiale de 1939-1945. Les antibiotiques sont la cause même de la hausse drastique de l'espérance de vie humaine au courant du 20^e siècle, puisqu'ils ont su prévenir la cécité et les amputations, contribuer à l'avancement de la chirurgie et des traitements de cancers, ainsi que protéger d'innombrables vies d'hommes et de femmes militaires[4]. Dès lors, les antibiotiques ont occupé, et continuent d'occuper encore en 2017, un rôle central dans la médecine comme étant une des thérapies médicales au taux de réussite le plus élevé[5]. Effectivement, les antibiotiques continuent de sauver à ce jour, des millions de vies chaque année à travers le monde[6]. Grâce à l'utilisation d'antibiotiques et à leur contribution sans précédent à l'avancement de la médecine, l'espérance de vie en 2015 était estimée à 71,4 ans en moyenne

mondialement (69,1 ans pour l'homme et 73,8 ans pour la femme)[7], soit 24 ans de plus qu'il y a 115 ans.

Cependant, comme tout organisme vivant doit assurer la survie de son espèce en situation de péril, l'utilisation d'antibiotiques mène les bactéries à développer des mécanismes de défense afin de déjouer les effets de ces derniers : c'est le phénomène de la résistance aux antibiotiques. La résistance bactérienne aux antibiotiques est souvent conférée par une information génétique appelée facteur R (*R factors*)[1]. Les facteurs R ou plasmides R (« R » pour résistance) sont des brins d'ADN circulaires qui codent pour l'expression d'une protéine permettant de contourner l'effet d'un antibiotique et donc d'assurer la survie de la bactérie en présence d'antibiotique. Les bactéries transfèrent entre elles ces plasmides, ce qui leur permet d'acquérir rapidement l'information génétique pour induire la résistance aux antibiotiques («transfert de gène horizontal»). Cette information peut être également transmise à leur descendants («transfert de gène vertical»)[8].

La consommation de viande et de produits laitiers en provenance d'animaux largement exposés aux antibiotiques ainsi que la libération des antibiotiques dans les eaux usées résultent en une consommation quotidienne d'antibiotiques par l'humain [9-10]. Ces consommations minimales d'antibiotiques, mais toutefois constantes, posent un risque élevé de transferts de plasmides R portant des résistances multiples aux antibiotiques entre les pathogènes résistants des animaux aux pathogènes des humains[9-10]. La surutilisation d'antibiotiques dans l'industrie de l'élevage devient une source d'inquiétude grandissante justifiée pour la santé de la population. En effet, une étude faite entre 2005-2008 dans 11 pays a montré qu'il existe une forte corrélation entre des souches de *E. coli* résistantes à de multiples antibiotiques, isolées d'échantillons sanguins humains et les souches de *E. coli* en provenance des animaux d'élevage (en particulier chez les volailles et cochons) [11].

La résistance aux antibiotiques est un fléau mondial grandissant dont les répercussions ne cessent de s'aggraver. En effet, les infections résultant de la résistance aux antibiotiques affectent en moyenne 2 millions de personnes et elles sont responsables de la mort annuelle de 23 000 personnes, et ce uniquement aux États-Unis[6, 12]. Dans l'Union Européenne, ce nombre s'élève à 25 000[13]. Par exemple, il est estimé qu'annuellement, parmi 40 millions de personnes en moyenne ayant été admis à l'urgence aux États-Unis avec des problèmes

respiratoires, 27 millions d'entre eux (68%) ont reçu des antibiotiques par mesure préventive alors que cela n'était pas nécessaire[14]. Si la tendance d'utilisation excessive d'antibiotiques se maintient, il est estimé que d'ici 2050, le bilan de mortalité annuelle résultant de la résistance aux antibiotiques s'élèvera à plus de 10 millions de personnes mondialement[15].

Le phénomène de résistance bactérienne n'est pas nouveau. En effet, quelques années seulement après l'introduction de la pénicilline sur le marché dans les années 1940, on y rapportait déjà des cas de résistance à cet antibiotique[1]. Alors que l'observation du phénomène de résistance bactérienne face à l'utilisation de divers antibiotiques commençait à être de plus en plus publié, une étude faite par Fleming *et al.* en 1972[16] a démontré entre autres la présence de plasmides R dans les échantillons cliniques de patients atteints d'infections urinaires pour les espèces bactériennes *Escherichia coli* (*E. coli*) et *Klebsiella aerogenes* (*K. aerogenes*) traités par le triméthoprim [17]. Utilisé pour la première fois comme antibiotique en 1962, le TMP est un composé synthétique de type diaminopyridine qui inhibe l'enzyme bactérienne dihydrofolate réductase (DHFR)[18]. C'est un antibiotique de grande importance qui est utilisé mondialement depuis plus de 50 ans afin de traiter les infections urinaires et pulmonaires[9]. Peu coûteux, efficace et donnant lieu à peu d'effets secondaires, le TMP est encore aujourd'hui largement utilisé dans le domaine vétérinaire en l'incorporant à la source alimentaire pour prévenir les infections à l'*E. coli* dans l'élevage de porcs, de bovins, de saumons et de crevettes[9]. Cette pratique prévient les infections chez les animaux d'élevage et ainsi les pertes financières associées pour l'industrie alimentaire. En effet, la mastite, une infection causée par *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*), touche les animaux impliqués dans la fabrication de produits laitiers et cause une perte de 2 milliards de dollars/an aux États-Unis seulement. Cette même infection avait causé en 2012 une perte de 485€/vache laitière dans l'Union Européenne[19].

En particulier, depuis plusieurs années, il existe une inquiétude grandissante concernant l'augmentation des cas de résistance au TMP et les impacts à long terme sur l'efficacité de cet antibiotique peu dispendieux[9]. En effet, dès 1974, 80 différentes souches bactériennes de type *E. coli* isolées des échantillons cliniques de l'Hôpital Saint-Joseph à Paris codaient pour la résistance au TMP[17]. Plus particulièrement, une source de résistance chez *E. coli* était conférée par le facteur R nommé R67, un plasmide codant pour l'expression d'une enzyme de type dihydrofolate réductase (DHFR) appelée DHFR R67.

La DHFR R67 constitue donc une cible pour le développement d'inhibiteurs. Ces inhibiteurs pourraient éventuellement donner lieu à de nouveaux antibiotiques servant à déjouer la résistance au TMP que confère la DHFR R67 à *E. coli*. Il est à noter que les DHFRs sont présentes dans chaque type d'organisme vivant, y compris l'être humain, car elles sont essentielles à la prolifération cellulaire[20]. Par conséquent, les DHFRs servent, depuis longtemps, de cibles thérapeutiques importantes et on doit donc en connaître les caractéristiques afin d'assurer la sélectivité de tout inhibiteur qui sera développé. Les caractéristiques des DHFR seront exposées dans la section suivante.

1.1.2. Les DHFRs R67, humaine et de *E. coli*

Les DHFRs sont des enzymes présentes dans tous les organismes (incluant procaryotes et eucaryotes)[21]. Les DHFRs catalysent la réduction du dihydrofolate (DHF) en tétrahydrofolate (THF) en utilisant le nicotinamide adénine dinucléotide phosphate (NADPH) comme cofacteur[18, 20, 22] (Figure 1-1). Le THF produit est un cofacteur essentiel pour la synthèse de thymidylate, de méthionine, de nucléotides de types purine ainsi qu'autres métabolites[23-24]. L'inhibition des enzymes de type DHFR empêche ainsi la synthèse de l'ADN et donc la division cellulaire, et donne lieu à la mort cellulaire. Les DHFRs chromosomales servent donc de cibles intéressantes pour le traitement de cancers ainsi que les infections bactériennes et parasitaires, par les médicaments de type antifolate [21, 25].

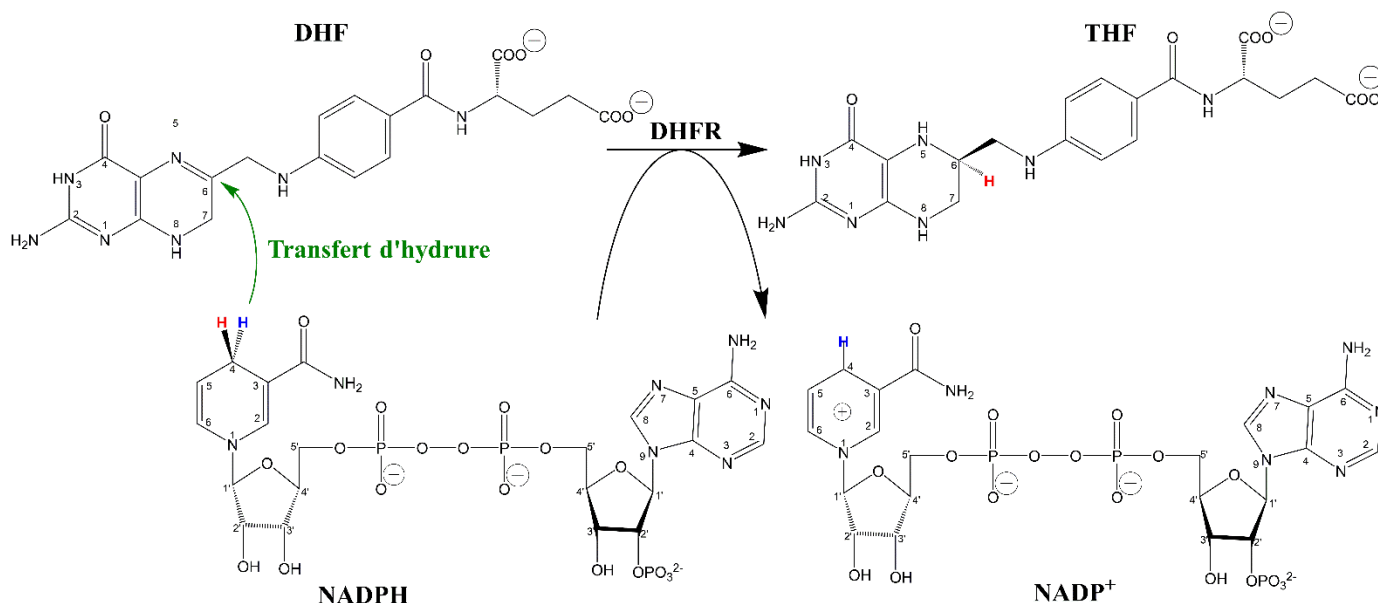
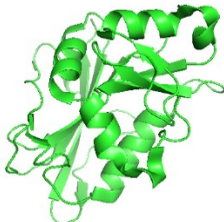




Figure 1-1 Réaction de catalyse des DHFRs

La réaction de catalyse des DHFRs passe par un transfert de deux atomes d'hydrogène, réduisant le substrat DHF en THF et oxydant le cofacteur NADPH en NADP⁺. Seule les groupements ptérine du substrat/produit et le groupement nicotinamide du cofacteur sont montrés pour la simplification de la figure. Figure adapté de [21].

Les DHFRs se divisent en deux grandes classes[26]. Les DHFRs de type I (ou dfrA) comprennent la DHFR humaine (hDHFR) et la DHFR de *E. coli* (ecDHFR). Les DHFR de type I sont des protéines monomériques de type α - β , constituées d'un feuillet β à 8 brins et de 4 hélices α , connectés entre eux par des boucles (voir la structure au Tableau 1-1)[20].

Tableau 1-1 Comparaison des enzymes hDHFR, ecDHFR et DHFR R67

Nom de l'enzyme	hDHFR chromosomale	ecDHFR chromosomale	DHFR R67 <i>E. coli</i> plasmidique
Structure cristalline	 Monomère (PDB : 4M6K) ^a	 Monomère (PDB : 1RA2) ^b	 Tétramère (PDB : 1VIE) ^c
Poids moléculaire (Da) Nombre d'acides aminés (aa)	21 453 Da ^d 180 aa ^d	18 000 Da ^e 159 aa ^f	34 000 Da ^e 4 × 78 aa ^g
K_M (DHF)	2.7 μM^h	1.2 μM^e	5.8 μM^e
K_M (NADPH)	4.0 μM^h	0.94 μM^e	3.0 μM^e
K_M ou K_d (FA)	K_M : 0.5 μM^i	- ^j	$K_{d,1}$: 120 μM^k $K_{d,2}$: 36 μM^k
K_i (TMP)	5.2 μM^h	20 pM ^e	595 μM^e
K_i (MTX)	3.4 pM ^l	1.0 pM ^l	> 500 μM^k

^a tiré de [27]; ^b tiré de [28]; ^c tiré de [29]; ^d tiré de [30]; ^e J. L. Toulouse, donnée non publiée ; ^f tiré de [24]; ^g tiré de [31]; ^h tiré de [32]; ⁱ tiré de [33], valeur de K_d non rapportée dans la littérature; ^j - : valeur non rapportée dans la littérature ; ^k tiré de [25]; ^l tiré de [24];

Le site actif des DHFRs de type I forme une poche bien enfouie et protégée par trois boucles qui se déplacent lors de la liaison des substrats et la libération des produits de la catalyse[21, 27]. Ce sont des enzymes dites 'chromosomales' étant donné que le gène qui les encode y est porté.

Les DHFRs de type I ont toutes en commun le fait qu'elles sont inhibées par le TMP et qu'elles sont thermosensibles[34]. Le TMP est un inhibiteur efficace et sélectif de DHFRs de type I microbiennes, dont la ecDHFR [18]. En effet, le TMP a une très grande affinité envers la ecDHFR (K_i de l'ordre du pM), mais une faible affinité pour la hDHFR (K_i de l'ordre du μM), ce qui en fait un antibiotique efficace (voir le Tableau 1-1)[21].

L'affinité d'une molécule envers une cible protéique peut être décrite par trois constantes principales, soient K_M , K_d et K_i . K_M est la constante de Michaelis, représentant l'affinité productive et équivaut à la concentration de substrat avec laquelle l'enzyme a atteint la moitié de sa vitesse maximale de catalyse. La constante K_d est la constante de dissociation d'une molécule (ligand) à une enzyme alors que K_i est la constante d'inhibition d'une molécule (inhibiteur). Des valeurs faibles de ces constantes reflètent une affinité plus élevée pour la cible.

L'affinité du TMP pour l'ecDHFR est 1000 fois plus élevée que pour la hDHFR (Tableau 1-1). Cette sélectivité vient du fait qu'il y a perte d'un pont H entre le groupement carbonyle C=O d'un résidu particulier chez les DHFR de mammifères (poulet, humain) et un des groupements amines -NH₂ du TMP comparativement à l'ecDHFR[35].

Les dérivés de diaminopyridines comme le TMP sont structurellement plus petits et différents des dérivés de folates comme le méthotrexate (MTX), qui ont une structure chimique similaire au substrat naturel des DHFRs (Figure 1-2), soit le DHF. La hDHFR et la ecDHFR sont donc inhibées par le MTX (Tableau 1-1) Le MTX est un inhibiteur compétitif efficace de hDHFR (K_i de l'ordre du pM, Tableau 1-1) comparativement au TMP et un médicament largement utilisé dans le traitement de cancers[21, 24].

Les DHFRs de type II (ou dfrB) ne possèdent aucune homologie de séquence ni de structure avec les DHFRs de type I, et sont résistantes au TMP. Les DHFRs de type II ont donc toutes en commun le fait qu'elles ne peuvent pas être inhibées par le TMP et qu'elles sont thermostables comparativement aux DHFRs de type I[34]. De plus, elles ne partagent aucune identité au niveau de la structure tertiaire avec les DHFR de type I[36]. La DHFR R67, introduite à la section précédente, appartient à cette classe. En effet, la DHFR R67 est une protéine tétramérique de type β , constituée de 4 barils β identiques; son site actif est formé d'un tunnel central composé des résidus venant de chacun des quatre monomères [20].

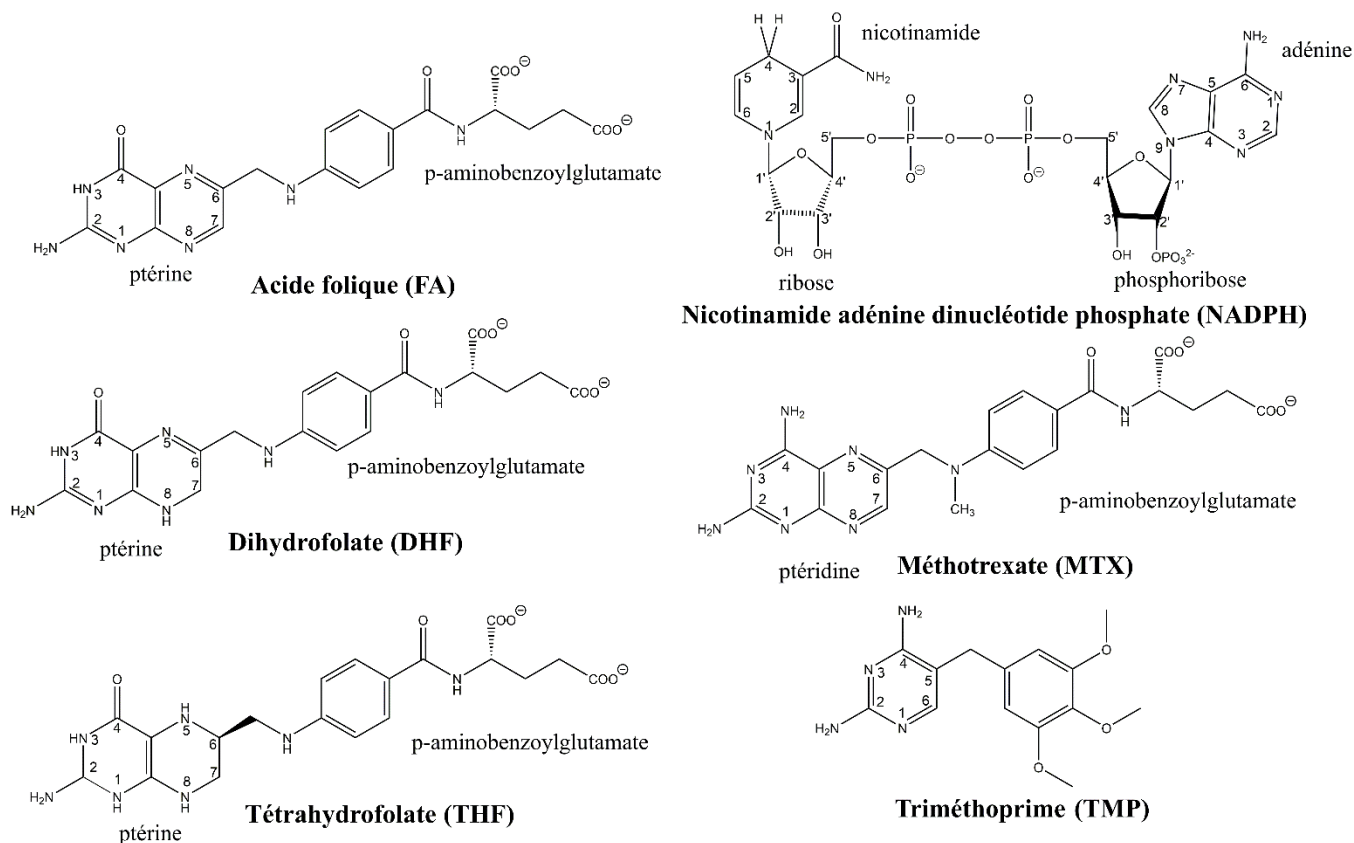


Figure 1-2 Structure chimiques des différentes molécules pouvant lier le site actif de la hDHFR, ecDHFR ou DHFR R67

Les six structures chimiques représentées sont celles de l'acide folique (FA), dihydrofolate (DHF), tétrahydrofolate (THF), nicotinamide adénine dinucléotide phosphate (NADPH), méthotrexate (MTX) et triméthoprim (TMP).

La DHFR R67 a donc la forme d'un beignet dont le trou central est un site actif traversant le long de la structure, détaillé à la Figure 1-3. Le site actif de la DHFR R67 permet un empilement compact de type sandwich entre le NADPH et le DHF grâce aux résidus de tryptophanes 38 (W38), glutamines 67 (Q67) et tyrosines 69 (Y69), afin de faciliter le transfert de l'hydrure pour la réaction de réduction (Figure 1-3). Pour que la catalyse se produise, le NADPH et le DHF doivent interagir avec le site actif de l'enzyme via des ponts H entre leur groupements amides et l'isoleucine 68 (I68) de la DHFR R67 (Figure 1-4)[9]. Il faut noter également que la présence de groupements -COOH dans la structure du DHF joue un rôle important dans la reconnaissance du substrat. En effet, ces groupements -COOH interagissent par des ponts H avec les lysines 32 (K32) de deux sous-unités monomériques différentes dans le site actif de l'enzyme [37]. Ce groupement -COOH carbonyle est également présent dans la structure dans l'acide folique (FA), un autre ligand de la DHFR R67 à coopérativité de liaison

positive (voir les valeurs de K_d au Tableau 1-1). Le groupement $-\text{COOH}$ est donc un motif souvent incorporé dans la structure des inhibiteurs développés afin de garantir une reconnaissance dans le site actif de la DHFR R67 et donc une inhibition efficace[9].

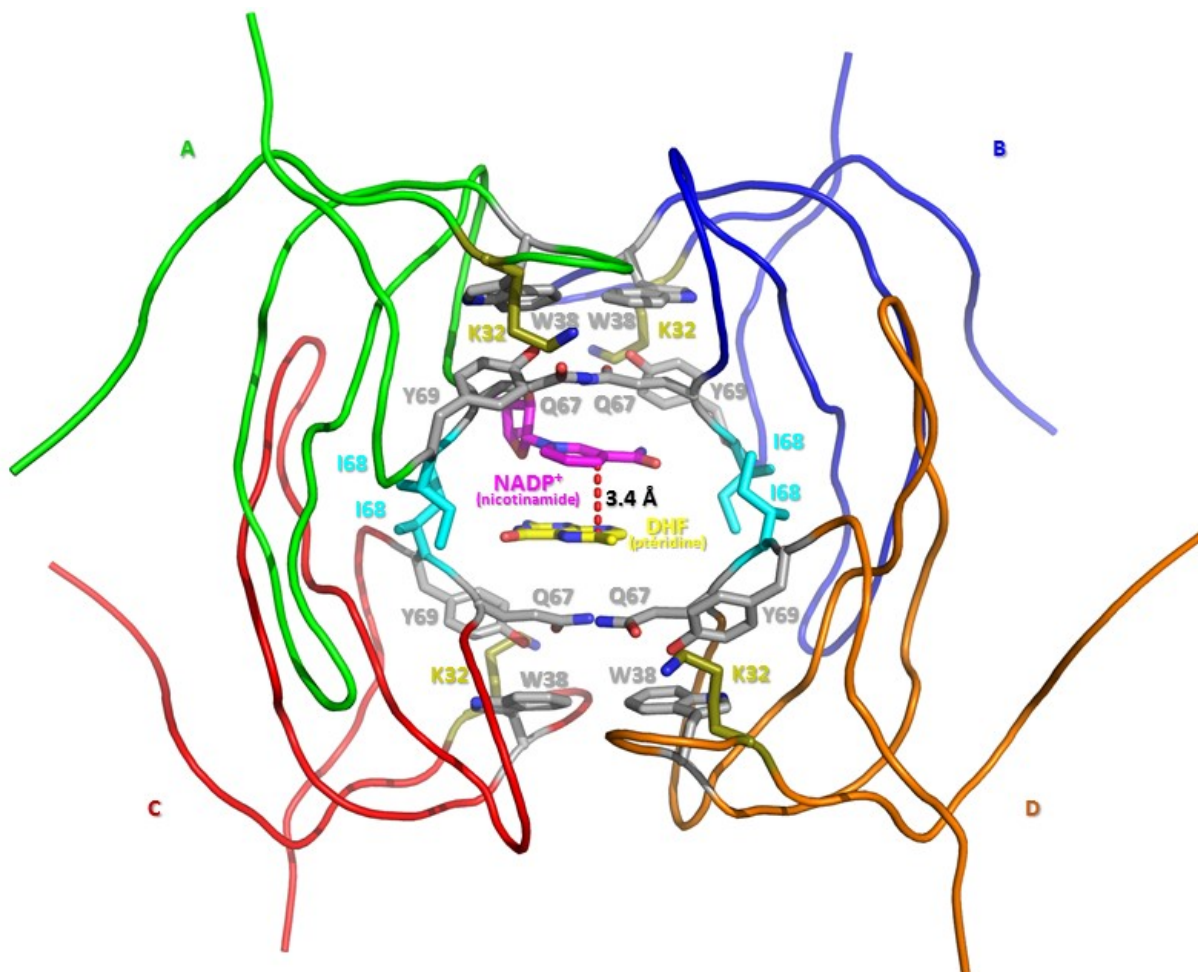


Figure 1-3 Site actif de la DHFR R67 catalysant la réaction de réduction du DHF en présence de NADPH

Cette structure cristalline (PDB : 2RK1) montre l'enzyme homotétramérique DHFR R67 avec une seule paire de ligands (asymétriques) formant un motif «sandwich». Chaque monomère est identifié par une couleur différente et nommé A-D. L'entrée du site actif fait face au lecteur. Les quatre résidus de tryptophane 38 (W38), qui contribuent à l'empilement des substrats, se situent sur les couches externes du «sandwich». À l'intérieur de la protéine, il est possible d'observer les deux couches composées des résidus de tyrosine 69 (Y69) et glutamine 67 (Q67) de type Y69-Q67-Q67'-Y69' résultant de la symétrie du site actif. Ces couches lient les anneaux de ptéridine du DHF (en jaune) et de nicotinamide du NADP^+ au centre du site actif (en magenta, seul le cycle ribonicotinamide est montré pour simplifier la figure). Un trait rouge illustre la proximité des atomes C4 (nicotinamide) et C6 (ptéridine) qui sont impliqués dans le transfert d'hydrure (figure adaptée de [38]).

Le site actif de l'enzyme (E) DHFR R67 est assez large pour donner lieu à des complexes non productifs $\text{E} \cdot (\text{NADPH})_2$ ou $\text{E} \cdot (\text{DHF})_2$ [39]. Cependant, le complexe productif $\text{E} \cdot \text{NADPH} \cdot \text{DHF}$ est favorisé au détriment des deux autres à cause du phénomène de

coopérativité positive de liaison particulière à cette enzyme[9, 39]. En effet, le NADPH se lie en premier à la DHFR R67, car son affinité ($K_d = 5.0 \pm 0.3 \mu\text{M}$) est 50 fois plus grande que celle du DHF ($K_d = 250 \pm 50 \mu\text{M}$)[39]. La formation du complexe E·NADPH est donc favorisée. La formation de ce complexe augmente de 50 fois l'affinité du DHF ($4.8 \pm 1.0 \mu\text{M}$) pour le site actif de l'enzyme, alors que l'affinité de liaison d'une seconde molécule de NADPH diminue de 19 fois ($96 \pm 4.0 \mu\text{M}$)[39]. Il en résulte une coopérativité de liaison positive favorisant la formation du complexe tertiaire E·NADPH·DHF et d'une coopérativité de liaison négative défavorisant la formation du complexe binaire E·(NADPH)₂[20, 39].

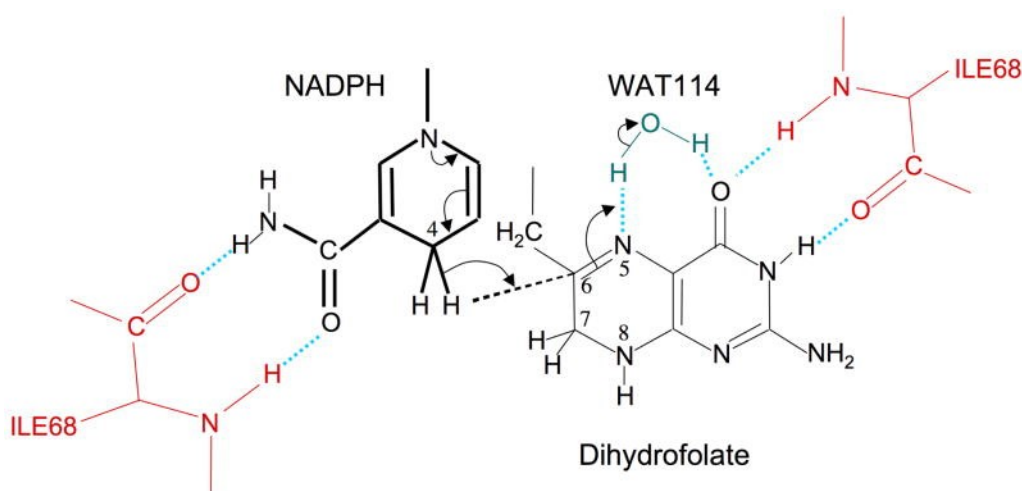


Figure 1-4 Interactions enzyme-substrats et mécanisme catalytique dans le site actif de la DHFR R67.

L'enzyme exploite une symétrie subtile entre le cofacteur NADP⁺ et le substrat DHF en interagissant de manière similaire avec le groupe amide nicotinamide NADP⁺, et avec le groupe amide N3-O4 de la ptéridine du DHF. Dans les deux cas, une paire de ponts H est formée avec l'amide des résidus d'isoleucine 68 (Ile68). Ces interactions ainsi que celles décrites à la Figure 1-3 optimisent les positions relatives des cycles aromatiques du NADPH et DHF pour favoriser le transfert d'hydrure de l'atome C4 du NADPH vers l'atome C6 du DHF. Ce transfert est suivi de, ou est concerté avec, la protonation de l'atome N5 du DHF, vraisemblablement par une molécule d'eau (WAT114) qui se trouve à une distance de l'ordre d'une liaison hydrogène de l'atome O4 du DHF. Figure tirée de [38].

D'abord, le fait que le cycle aromatique du TMP et du MTX aient une amine à la place d'un groupement amide comme dans le cas du DHF (voir la Figure 1-2) empêche la liaison du TMP ou du MTX à la DHFR R67 [25, 38]. De plus, comparativement à la hDHFR et à la ecDHFR, la DHFR R67 ne possède pas de groupement carboxylate -COO⁻ dans son site actif pour interagir avec l'azote protoné N1 du TMP et du MTX (Figure 1-2)[29]. Ainsi, ces deux facteurs confèrent à la DHFR R67 une résistance face au TMP et au MTX (valeurs de K_i de l'ordre du μM , Tableau 1-1)[29]. Ce mécanisme de résistance bactérienne au TMP s'inscrit

parmi plusieurs dont, entre autres, l'imperméabilité de la paroi membranaire (résistance intrinsèque), le développement de nouvelles voies métaboliques alternatives, la production d'une DHFR de type I résistante et une surproduction d'une DHFR de type I[18].

Ainsi, dans le cas où la DHFR R67 ou d'autres DHFR de type II intrinsèquement résistantes au TMP[18, 22] seraient fortement répandues chez les bactéries pathogènes, le TMP deviendrait désuet en tant qu'antibiotique pour traiter les infections urinaires et pulmonaires. Pour cette raison, nous nous sommes penchés sur le développement de nouveaux inhibiteurs de la DHFR R67. À cet effet, développer une méthode de criblage de molécules permettant d'extraire des informations sur l'affinité pour la cible étudiée (telle la constante K_d) permettrait d'identifier des inhibiteurs potentiels de cette source de résistance au TMP. La prochaine section décrit les techniques présentement utilisées pour la découverte d'inhibiteurs.

1.2. Les techniques utilisées pour le criblage d'inhibiteurs

Pour faciliter le développement de nouveaux antibiotiques en réponse au problème croissant de la résistance bactérienne, il est essentiel de développer des méthodes de criblage rapides, peu coûteuses et efficaces afin d'identifier des inhibiteurs potentiels. Effectivement, le développement d'un nouveau médicament, de l'idée à la mise en marché, est un processus complexe pouvant prendre en moyenne 12-15 ans, ainsi que 1 milliard de dollars d'investissement[40]. Ce long processus commence par l'identification et la validation de la cible à étudier. Dans cette recherche de base, il y a collecte de données pour développer une hypothèse selon laquelle l'inhibition ou l'activation d'une protéine ou d'une voie de signalisation/métabolique entraînera un effet thérapeutique sur le patient malade[40]. Le résultat de ces tests d'inhibitions ou d'activation servira d'étape «entonnoir» pour la sélection et la justification de la cible à étudier.

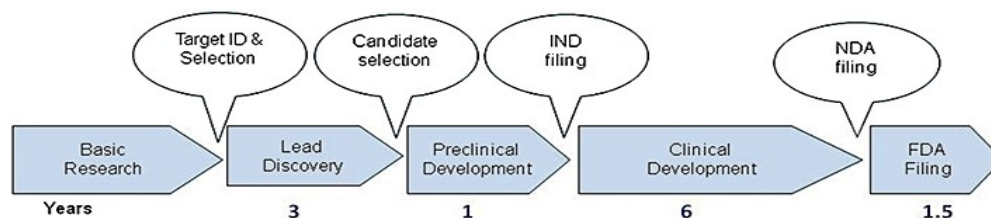


Figure 1-5 Processus de découverte de médicaments

Le processus débute par l'identification (ID) et la validation de la cible à cribler. Cela est suivi de tests de criblage pour la sélection d'un composé en tant de candidat pour les tests cliniques futurs. Définitions: FDA, Food and Drug Administration; IND, Investigational New Drug; NDA, New Drug Application. Figure tirée de [40].

La deuxième étape du développement d'un médicament consiste à mettre en place une méthode de criblage permettant l'identification de molécules inhibitrices ou activatrices de la cible potentielle. ***Le développement des méthodes de criblage est l'unique étape qui fera l'objet des travaux rapportés dans ce mémoire.*** Un criblage consiste à mesurer les propriétés chimiques ou physiques d'un système sous les conditions (concentration, température, solvant, nature des réactifs, etc.) afin d'identifier une méthode fiable pour en rapporter les variations d'activité. Un essai de criblage d'inhibiteurs implique des molécules pouvant être de petite taille (appelés fragments, $M_w < 300$ Da) ou de grande taille (par exemple, lors du criblage d'extraits de composés naturels[41]). On entreprendra le criblage de façon ciblée, avec un nombre limité de composés, ou encore un criblage à haut débit qui consiste à analyser plusieurs milliers ou

centaines de milliers de molécules [42]. Suite à l'identification de molécules à fort potentiel de moduler l'activité de la cible selon l'effet recherché, on entreprendra l'optimisation de la structure de ces molécules potentielles afin de les rendre plus puissantes, biodisponibles ou métabolisables. Enfin, on choisira une molécule candidate pour initier le développement clinique[40].

Dans le cas de l'identification d'inhibiteurs ayant un potentiel pour le développement de nouveaux antibiotiques, l'objectif de l'essai de criblage est de détecter une liaison spécifique entre les composés criblés et la cible protéique. Les tests de criblage sont initialement entrepris *ex vivo* (en cellules, lysats cellulaires ou avec la cible purifiée)[43] sauf dans les rares cas où la cible pour une maladie est inconnue et qu'il n'existe aucun modèle cellulaire de la maladie; dans ce cas, le criblage sera entrepris *in vivo* (dans les organismes vivants comme les mouches, rats ou chiens), ce qui en augmente dramatiquement les coûts et la durée[40, 44]. Notons que l'avantage principal des tests de criblage *in vivo* aux tests *ex vivo* est que l'effet thérapeutique désiré du composé criblé est immédiatement observé. Cependant, l'un des inconvénients des méthodes *in vivo* est qu'elles sont susceptibles de favoriser des interférences due à la matrice ou membrane cellulaire[45], au métabolisme des animaux impliqués dans les tests, sans compter les interférences des composés avec l'essai utilisé ou des signaux générés par des molécules autres que la cible désirée (effet *off-target*)[42]. De plus, contrairement aux tests *ex vivo*, les tests *in vivo* ne permettent pas d'avoir des informations concernant les interactions entre les composés criblés et la cible. Ce manque d'informations concernant ces interactions empêche une amélioration rationnelle de la structure chimique des composés criblés afin d'obtenir de meilleures affinités pour la cible.

Ainsi, par ces inconvénients, il est préférable d'initier les tests de criblage d'inhibiteurs par des tests *ex vivo* lorsque la cible provoquant la mort cellulaire est connue. Les tests *ex vivo* comprennent deux grandes techniques analytiques : les techniques (1) biochimiques et (2) biophysiques[46].

Les techniques biochimiques ont pour but de suivre la formation ou la consommation de produits chimiques. Dans le domaine de criblage d'inhibiteurs, la méthode biochimique classique utilisée est d'observer l'effet d'inhibition d'un composé sur l'activité enzymatique de la cible[47]. Les avantages des tests de criblages basés sur les essais enzymatiques sont

qu'elles permettent de confirmer qu'il y a inhibition de l'enzyme par les composés criblés. De plus, cette méthode est appropriée pour les criblages tant à bas, moyen et haut-débit due à la facilité de l'essai et de l'instrument impliqué (spectrophotomètre). On y obtient alors des informations sur l'efficacité de l'inhibiteur par les constantes K_i et IC_{50} (concentration à laquelle 50% de l'activité enzymatique est inhibée)[45, 47]. Ces tests enzymatiques sont effectués la plupart du temps par des mesures spectrophotométriques d'absorbance ou de fluorescence afin d'observer la formation ou production de molécules chimiques lors de la catalyse. Par conséquent, l'un des inconvénients des essais enzymatiques est que les molécules utilisées dans l'essai doivent absorber la lumière ou être marquées par des molécules fluorescentes afin d'être détectées[44]. De plus, lors de criblage préliminaire impliquant des composés à faibles affinités, l'essai nécessite d'importantes concentrations de substrats (ex. DHF) ou de cofacteurs dispendieux (ex. NADPH) afin d'observer une inhibition pouvant résulter en une variation significative du signal spectrophotométrique[48]. Un autre inconvénient est que les tests enzymatiques sont souvent sujets à des composés donnant des faux positifs appelés PAINS (*Pan Assay Interference Compounds*)[46]. Ces composés sont des molécules pouvant générer une inhibition apparente sans nécessairement se lier à l'enzyme cible. En effet, il est possible que les PAINS interagissent avec les substrats ou cofacteurs, interfèrent directement avec le signal de l'essai ou modulent l'environnement de l'enzyme (ex. dénaturation partielle de l'enzyme)[46]. Ces trois situations résultent donc en une baisse de l'activité enzymatique et peuvent être interprétées comme étant une inhibition. ***Ainsi, le désavantage majeur des essais biochimiques enzymatiques est qu'il est possible de confirmer qu'un composé est un inhibiteur, mais qu'il n'est pas possible de confirmer si cet inhibiteur lie la cible enzymatique.***

Les techniques biophysiques consistent à suivre ou visualiser la liaison du composé à la cible protéique[44]. Les techniques biophysiques comprennent la mesure de la dénaturation thermique à base de fluorescence (DSF), la mesure de la polarisation de la fluorescence (FP), la titration calorimétrique isothermale (ITC), la spectroscopie de résonance magnétique nucléaire (RMN), la résonance des plasmons de surface (SPR) ainsi que la cristallographie de protéine à rayon X (PX)[42, 48]. Ces techniques impliquent chacune des paramètres particuliers à considérer pour le type de criblage d'inhibiteur effectué (bas, moyen et haut débit) (Tableau 1-2).

Tableau 1-2 Résumé des paramètres importants de différentes techniques analytiques biophysiques pour le criblage de fragments.

Tableau^a adapté de [42].

Technique	Débit du criblage	Quantité de matériel utilisée	Immobilisation covalente	Intervalle de K_d détectable	Information sur le site actif
DSF	Haut	Moyenne	Non	Jusqu'à 5mM	Aucune
FP	Haut	Faible	Non	Jusqu'au K_d du marqueur fluorescent	Limitée à la compétition
RMN	Moyen	Moyenne	Non	Jusqu'au bas nM - 10mM	Bonne
ITC	Bas	Élevée	Non	Jusqu'au bas nM - 5 mM	Limitée à la compétition
SPR	Moyen	Faible	Requise	pM - 2 mM	Limitée à la compétition
PX	Bas	Moyenne	Non	Jusqu'à la solubilité du ligand	Excellente

^a où DSF : dénaturation thermique à base de fluorescence; FP : polarisation de la fluorescence; RMN : résonance magnétique nucléaire; ITC : titration calorimétrique isothermale; SPR : résonance des plasmons de surface; PX : cristallographie de protéine à rayon X

Les avantages des méthodes biophysiques sont nombreux puisqu'elles favorisent entre autres [42]:

- une mesure directe des événements de liaisons à la cible
- le criblage de n'importe quelle classe de protéine cible
- la détection et la caractérisation de ligands à faibles affinités
- l'obtention d'informations critiques pour l'optimisation subséquente des composés criblés (exemple : structure cristalline, localisation du site actif de l'enzyme, etc.).

De plus, les techniques biophysiques n'impliquent souvent que l'enzyme et le ligand, ce qui exclut l'utilisation de substrats ou de cofacteurs dispendieux, contrairement aux essais enzymatiques biochimiques. *Cependant, le désavantage majeur des essais biophysiques est qu'il est possible de confirmer qu'un composé est un ligand, mais qu'il n'est pas possible de confirmer si ce ligand inhibe la cible enzymatique.*

Si l'on considère les avantages et désavantages des six méthodes biophysiques présentées au Tableau 1-3, il est possible de constater qu'un essai de criblage d'inhibiteurs par SPR offre plus d'avantages que les autres méthodes. Cependant, la SPR présente des désavantages non négligeables. En effet, tel que montré au Tableau 1-3, la SPR nécessite l'immobilisation d'un des partenaires de liaison à une surface. De plus, la SPR nécessite plusieurs étapes d'optimisation et de validation puisqu'elle est sujette aux interactions non spécifiques provenant en grande partie de la liaison des molécules criblées aux espaceurs chimiques utilisés pour immobiliser la protéine. De plus, bien que la SPR permette l'observation directe de la liaison, il est difficile d'obtenir de l'information sur le mode et le site de liaison.

Malgré ses limites, la SPR permet d'obtenir une quantité élevée d'informations sur le composé criblé, telles les constantes d'affinité (K_d), de vitesse d'association (k_{on}) et de dissociation (k_{off}), en plus de la stoechiométrie de liaison (n). Cela constitue l'avantage principal de cette technique analytique biophysique. De plus, la SPR est actuellement la méthode d'analyse sans marquage[48] la plus commercialisée pour mesurer les événements de liaisons[49].

Par conséquent, les techniques biochimiques permettent de confirmer si un composé est un inhibiteur alors que les techniques biophysiques permettent de confirmer si un composé est un ligand. Ce sont deux techniques apportant des informations complémentaires, ce qui en fait des techniques orthogonales. Il est connu que des essais de criblage basés sur une combinaison de méthodes orthogonales, c'est-à-dire biochimique et biophysique, permettent de réduire significativement les faux positifs concernant l'identification d'inhibiteurs intéressants[46, 48, 50]. Cela aide à diriger les décisions pendant le développement de ces agents chimiques en chimie médicinale lors de l'optimisation d'inhibiteurs[42].

Tableau 1-3 Résumé des avantages et désavantages relatifs aux différentes techniques analytiques biophysiques concernant le criblage, la validation ainsi que la caractérisation de fragments
Tableau adapté de [42].

Technique	Avantages	Désavantages
DSF	<ul style="list-style-type: none"> • Criblage à haut débit • Essai de liaison directe 	<ul style="list-style-type: none"> • Sujet aux faux positifs et négatifs • Requiert un appareillage lourd
FP	<ul style="list-style-type: none"> • Criblage à haut débit • Essai de compétition de liaison 	<ul style="list-style-type: none"> • Sujet aux faux positifs et artéfacts • Requiert le marquage de ligands
RMN (ligand observé)	<ul style="list-style-type: none"> • Criblage à débit moyen 	<ul style="list-style-type: none"> • Sujet aux faux positifs causés par des agrégations ou des effets non spécifiques
RMN (protéine observée)	<ul style="list-style-type: none"> • Criblage à débit moyen • Identification du site actif possible (requiert assignation des pics) • Mesure de K_d possible par un titrage du ligand 	<ul style="list-style-type: none"> • Limitée aux petites (<30 kDa) cibles protéiques solubles • Requiert un marquage dispendieux isotopique de protéines • Requiert un appareillage lourd
ITC	<ul style="list-style-type: none"> • Essais de compétition de liaisons directes • Multiples informations fournies (K_d, ΔH, ΔS et n) 	<ul style="list-style-type: none"> • Criblage à bas débit • Requiert d'importants changements de chaleur lors des événements de liaisons pour des mesures fiables • Requiert un appareillage lourd
SPR	<ul style="list-style-type: none"> • Détection sans marquage • Automatisation de la technique facile • Essais de compétition de liaisons directes • Nécessite peu de matériel • Multiples informations fournies (K_d, k_{on}, k_{off} et n) 	<ul style="list-style-type: none"> • Requiert l'immobilisation d'un des deux partenaires de liaison à la surface • Sujet aux artéfacts causés par des agrégations ou des effets non spécifiques • Requiert une longue optimisation de l'essai
PX	<ul style="list-style-type: none"> • Criblage à débit moyen • Identification rapide du site de liaison ainsi que du mode de liaison du ligand 	<ul style="list-style-type: none"> • Requiert des sources émettrices de rayons X dispendieuses (accès aux synchrotrons) • Limité aux protéines solubles qui peuvent cristalliser

^a où DSF : dénaturation thermique à base de fluorescence; FP : polarisation de la fluorescence; RMN : résonance magnétique nucléaire; ITC : titration calorimétrique isothermale; SPR : résonance des plasmons de surface; PX : cristallographie de protéine à rayon X

La combinaison de techniques biophysiques, telle la SPR, aux techniques biochimiques enzymatiques est une pratique commune pour la sélection d'inhibiteurs d'enzymes. En effet, la corrélation des valeurs de K_d obtenu par SPR et de IC_{50} par tests enzymatiques a été utilisé pour l'identification d'inhibiteurs d'enzymes de type métallo β -lactamases[46], de protéines G couplés à des récepteurs (GPCR)[48], lysines méthyltransférase[51], ou ligase d'ubiquitine pour la maladie de Parkinson[52]. Dans le cas de la DHFR R67, un test de criblage enzymatique préliminaire pour les inhibiteurs a déjà été développé par notre groupe de recherche en 2012[9]. Ainsi, si cette technique pouvait être accompagnée d'une technique orthogonale biophysique en SPR par exemple, cela permettrait de confirmer que les inhibiteurs criblés sont effectivement des ligands de la DHFR R67, plutôt que des PAINS. La connaissance de la constante d'affinité K_d permettra une première identification de molécules prometteuses lors d'un criblage de moyen débit en vue d'une optimisation éventuelle de leur effet thérapeutique. Considérant les avantages significatifs présentés au Tableau 1-3, la SPR s'avère pertinente comme méthode analytique pour le développement d'une plateforme de criblage d'inhibiteurs d'une cible enzymatique. Il convient donc d'explorer les principes de base encadrant le fonctionnement de la SPR dans la section suivante.

1.3. La résonance des plasmons de surface (SPR) et les nanoparticules d'or (AuNPs)

1.3.1. Les principes de la SPR

La résonance des plasmons de surface (SPR) est une technique analytique basée sur l'oscillation des électrons d'une couche métallique mince. Elle permet entre autres de faire la détection de molécules se liant à, ou près de, la surface métallique, en y mesurant les changements d'indice de réfraction[53-54].

Les plasmons de surface (SPs) sont des ondes électromagnétiques de surface qui se propagent parallèlement à une interface métal/milieu diélectrique[55]. Un milieu diélectrique est un milieu qui ne peut conduire l'électricité mais qui peut être polarisé sous l'effet d'un champ électrique. Les SPs sont donc une oscillation collective des électrons à la surface du métal. Pour que les SPs existent à une telle surface, il faut que la partie réelle de la constante diélectrique, $Re(\epsilon)$, des deux côtés de l'interface soient de signe opposé[56]. Cette condition est rencontrée dans la région visible-infrarouge pour les interfaces air/métal et eau/métal (où ϵ du métal est négatif et celui de l'air ou de l'eau est positif)[57].

L'or et l'argent sont couramment utilisés pour les mesures en SPR mais d'autres métaux comme le cuivre, le titane ou le chrome peuvent également produire des SPs[58]. Cependant, l'or demeure le métal le plus utilisé en SPR puisqu'il permet l'utilisation de diverses chimies de modifications de surface et qu'il ne s'oxyde pas[42]. Les SPs sont créés lorsque l'énergie d'oscillation lumineuse des photons polarisés interagissent avec les modes d'oscillation des électrons libres présents dans la couche mince métallique dans le même plan. Ainsi, la polarisation de la lumière correspond à l'orientation d'un champ électrique selon le plan de la surface métallique. La polarisation de la lumière se nomme « s » si elle est parallèle au plan et sert de référence (Figure 1-6) [55, 58]. Un champ électrique appliqué perpendiculairement à la surface permet d'exciter les SPs. Ainsi, une polarisation dans le plan de la surface, nommée « p », permet de sonder le plasmon (Figure 1-6) [55]. Les SPs sont des ondes évanescentes des deux côtés de l'interface air/métal ou eau/métal, *i.e.* des ondes dont l'amplitude diminue exponentiellement avec la distance (Figure 1-7). Ces ondes ont donc leur maximum d'intensité

à l'interface et elles diminuent d'intensité à partir de ce point vers une phase frontière qui a une épaisseur de pénétration de l'ordre de 300 nm[42, 55, 59]. Cette couche de 300 nm au-dessus de la surface métallique est donc le domaine utile où on peut sonder les événements de liaison; on en comprend qu'il importe de concevoir des systèmes moléculaires nanométriques.

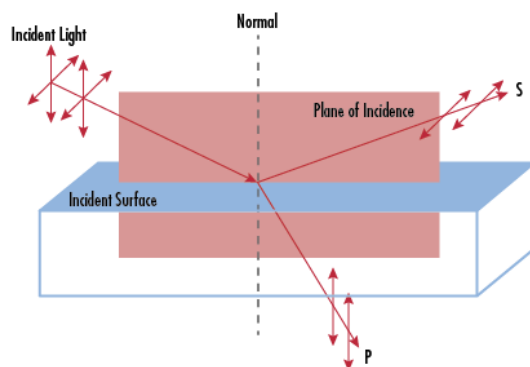


Figure 1-6 La polarisation S et P de la lumière définies

Les polarisations «s» et «p» de la lumière sont définies par rapport à leur orientation relative de propagation par rapport au plan d'incidence et au plan de la surface incidente. Une lumière est polarisée en «s» si elle se propage parallèlement à la surface, alors qu'elle est dite polarisée en «p» si elle se propage perpendiculairement à celle-ci. Figure reproduite de [60].

Les SPs ne peuvent être directement excités à l'interface air/métal ou eau/métal, car les conditions d'harmonisation des moments entre l'oscillation de la lumière et des électrons de la surface ne peuvent être satisfaites[57]. C'est la raison pour laquelle un prisme est utilisé comme dispositif de couplage indirect entre l'onde de la source incidente et l'onde d'oscillation des électrons à la surface[58]. Par l'utilisation d'un prisme, deux configurations expérimentales sont possibles, soit celle d'Otto ainsi que celle de Kretschmann où celle de Kretschmann est de loin la plus répandue(Figure 1-7)[61].

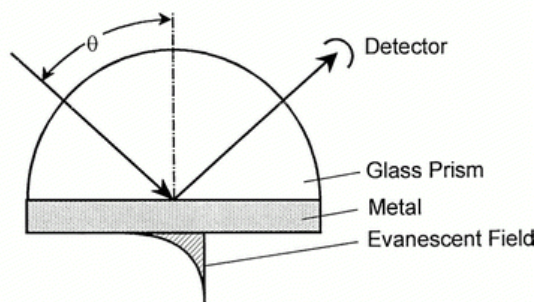


Figure 1-7 Configurations de Kretschmann en SPR

La configuration de Kretschmann est basée sur la réflexion interne totale atténuée de la lumière excitatrice pour l'excitation des SPs. Les flèches droites représentent le parcours du faisceau lumineux : faisceau incident, à gauche, et faisceau réfléchi, à droite. Figure reproduite de [61].

La SPR est hautement sensible aux changements se produisant dans l'environnement très proche de l'interface métal-solution, alors qu'elle est insensible aux événements se produisant dans la solution à plus d'environ 300 nm de la surface d'or. Ainsi, la liaison d'une molécule à la surface du senseur produira un changement de l'indice de réfraction à l'interface, générant une variation de l'angle de résonance des SPs[42]. Plus précisément, la fixation de molécules sur une interface or/eau (par exemple) change l'amplitude et la phase de l'onde d'oscillation des SPs, ce qui change également l'onde du faisceau réfléchi (Figure 1-7). L'indice de réfraction η change, car le comportement de la lumière dans le milieu change également. Cette valeur peut être rapportée en unité d'indice de réfraction (RIU). Ainsi, si la surface subit une augmentation de son indice de réfraction (densité optique), cela causerait une résonance entre les SPs et la lumière incidente à de plus basses énergies, donc à de plus hautes longueurs d'onde. De ce fait, la mesure des variations de longueur d'onde du faisceau réfléchi permet de suivre, en temps réel, l'interaction de molécules sur, ou près de, la surface d'or.

Généralement, les mesures en SPR sont prises de l'une des trois manières suivantes: (a) par balayage d'angles SPR (aussi nommé déplacement d'angle SPR) (b) par imagerie SPR (c) par mesure de la variation de la longueur d'onde SPR[55, 58]. La méthode la plus utilisée, soit le balayage d'angles SPR, utilise une longueur d'onde fixe pour exciter les SPs. Cette méthode permet de mesurer le pourcentage de réflectivité du faisceau réfléchi (%R) en fonction de l'angle du faisceau incident[58]. Ainsi, si un événement de liaison donne lieu à un important changement de longueur d'onde, le %R à la longueur d'onde d'origine diminuera. Cette méthode n'a pas été exploitée dans nos travaux car elle exige des instruments lourds et dispendieux, et donc sont peu appropriés pour le développement de méthodes.

L'imagerie SPR (appelé également microscopie SPR) consiste à mesurer les variations d'indices de réfraction d'une surface métallique tout en capturant en parallèle des images successives de la surface avec une caméra[54, 58, 62]. Cette méthode n'a pas été retenue dans le contexte de ces travaux car elle est avantageuse pour visualiser des cellules vivantes individuelles dans le cas de diagnostics cliniques[54] tel que des contrôles antidopages[62], mais n'est pas appropriée pour le criblage d'inhibiteurs.

Une méthode alternative, soit celle exploitée dans le cadre de ces travaux, consiste à fixer l'angle d'incidence et de mesurer la réflectivité (%R) en fonction de la longueur d'onde

[55, 58]. Dans ce cas, un minimum de la réflectivité apparaît à une longueur d'onde; ce minimum se déplace selon les changements d'indice de réfraction par la nature des molécules liées à l'interface or/eau (par exemple). Sous les conditions appropriées (distance de la surface, nature des molécules et du solvant), l'ampleur du déplacement sera essentiellement proportionnel à la masse de molécules liées[53].

Comme il s'agit de mesurer une variation de longueur d'onde, une instrumentation légère peut être adoptée. À cet effet, nous utilisons un instrument portatif développé dans le laboratoire du Professeur J.-F. Masson, au département de chimie de l'Université de Montréal. L'appareil SPR (nommé P4-SPR) comporte un système à la configuration de Kretschmann permettant de faire des mesures en triplicatas dans un montage simple, peu spacieux et abordable[63].

Typiquement, les signaux en SPR sont compilés dans un graphique nommé sensorgramme (Figure 1-8). Étant donné que les changements de l'indice de réfraction de la surface (*i.e.* le signal SPR) sont proportionnels à la masse liant la surface à une distance ≤ 300 nm ainsi qu'aux changements de la nature du milieu [42, 55, 59] (Figure 1-9), il est donc possible de mesurer en temps réel par les sensorgrammes l'affinité ainsi que la cinétique des interactions entre les molécules injectées et la surface. Ainsi, un événement de liaison ayant lieu sur, ou près de la surface d'or donne lieu à un déplacement bathochromique (*red shift*) de λ_{SPR} , alors qu'un événement de dissociation donne lieu à un déplacement hypsochromique (*blue shift*) de λ_{SPR} [42].

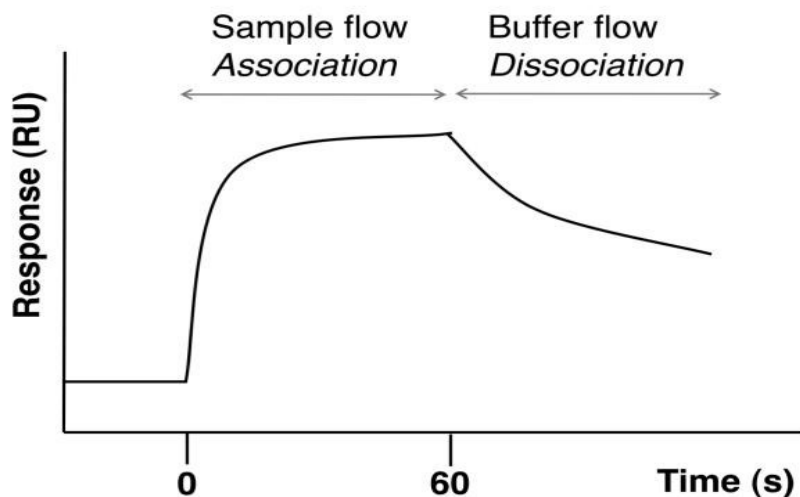


Figure 1-8 Sensogramme typique observé par l'utilisation d'un biosenseur en SPR

Une fois la ligne de base stabilisée, à $t = 0$ s, une solution contenant l'un des partenaires de liaison (par exemple, un ligand de petite taille) est injectée sur la surface à laquelle est attaché l'autre partenaire de liaison (par exemple, une protéine immobilisée). À mesure que le ligand lie la protéine, le signal varie en raison de l'augmentation de la quantité (masse) de matière à la surface. L'analyse de la courbe de liaison donne la constante de vitesse observée (k_{obs}). La constante de vitesse d'association de l'interaction (k_{on}) est obtenue si la concentration de ligand est connue, selon l'équation $k_{obs} = k_{on}[L] + k_{off}$. À l'équilibre (ici à $t = 60$ s), un tampon est injecté afin de remplacer la solution de ligand. L'analyse de la courbe donne la constante de vitesse de dissociation (k_{off}). Le niveau de réponse à l'équilibre peut donner la concentration de ligands actifs dans l'échantillon. La constante d'affinité est calculée selon $K_d = k_{off} / k_{on}$. Une solution de régénération (par exemple une solution hautement saline, de faible pH, etc.) est alors injectée pour perturber les interactions non covalentes et régénérer la surface. Figure reproduite de [42].

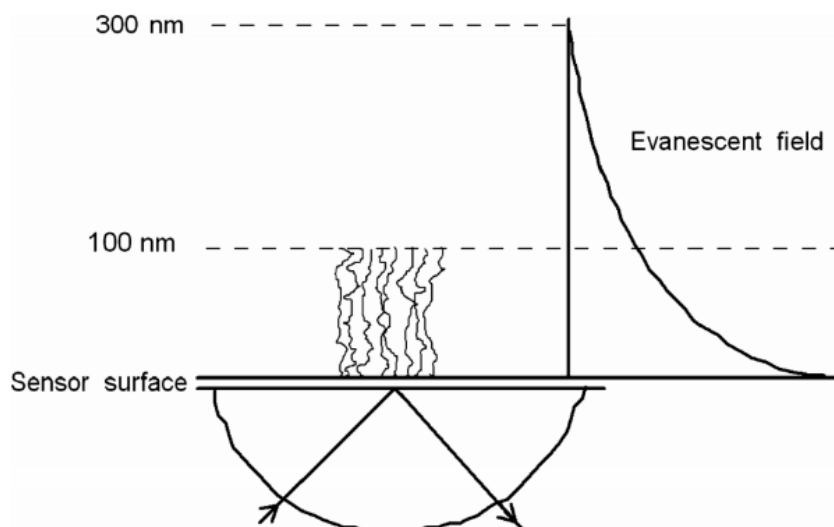


Figure 1-9 Représentation de la limite de détection en SPR.

La figure montre une vue schématique d'une surface formant le capteur SPR avec couche de molécule et ainsi que la diminution exponentielle du champ évanescent de la surface qui ne peut sonder les changements d'indice de réfraction en solution qu'à un maximum de 300 nm de la surface. Figure reproduite de [59].

Ces courbes de liaisons sont typiquement mesurées sur une gamme de concentrations différentes de ligand, car l'affinité peut également être déterminée à partir de la variation du signal SPR observé en fonction de la concentration de ligands utilisée[42]. Cela permet d'obtenir en outre les constantes k_{on} et k_{off} , qui par un simple rapport de ces deux constantes permettent d'obtenir la constante d'affinité K_d .

Dans le domaine de la biodétection, le jumelage de la SPR à un biocapteur s'avère très utile. En effet, un biocapteur ou biosenseur est un système composé de plusieurs éléments : un élément de reconnaissance moléculaire (récepteurs) situé à la surface du mince film d'or, un dispositif optique pour collecter la lumière réfléchie, un détecteur (spectrophotomètre) et un enregistreur (ordinateur) (Figure 1-10)[44]. L'utilisation d'un biocapteur immobilisé à une surface permet de mesurer des interactions intermoléculaires par la liaison de la molécule d'intérêt injectée dans l'appareil. La méthode d'immobilisation du récepteur doit être efficace afin de contrôler la quantité de matériel immobilisé de manière stable et éviter des variations imprévues.

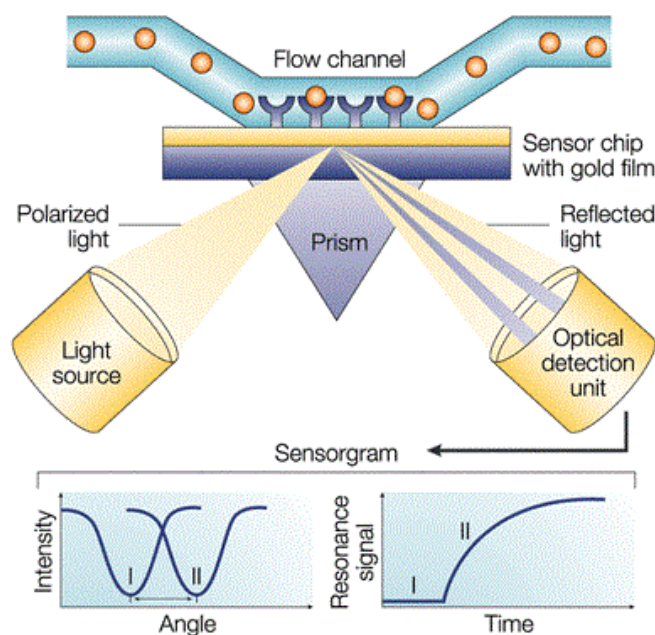


Figure 1-10 Principe d'un biocapteur SPR

L'instrument SPR comprend une cellule fluide permettant l'injection de solution à une surface d'or où une molécule réceptrice y est immobilisée. Une source lumineuse polarisée excite les SPs de la surface d'or pour y détecter les changements d'indices de réfraction de la surface qui se transmettent par des changements de la lumière réfléchie. Le faisceau de lumière réfléchi est collecté par un détecteur optique qui convertit les informations de déplacement d'angle, de longueur d'onde ou de changements d'intensité lumineuse sous la forme d'un sensorgramme. Figure reproduite de [44].

Les récepteurs sont généralement immobilisés en utilisant un couplage covalent avec la surface d'or. Le couplage 1-éthyle-3-(3-diméthylaminopropyl)-carbodiimide (EDC)/N-hydroxysuccinimide (NHS) constitue l'approche la plus commune concernant l'immobilisation de protéines sur une surface d'or (Figure 1-11)[42, 59]. Ce couplage qui consiste à faire réagir les groupements amine primaire d'une protéine (ex. lysines) avec les groupements acide carboxylique (ex. monocouche auto-assemblée sur le prisme) suite à une réaction par le EDC et le NHS [42]. L'alternative la plus commune à ce couplage est d'immobiliser directement le récepteur par des groupements thiols (cystéines) pouvant générer de fortes liaisons à caractère covalent avec les atomes d'or.

Le biocapteur utilisant la SPR constitue une technique ayant une haute sensibilité pour les mesures d'indice de réfraction, sans l'utilisation de marquage tel qu'expliqué à la section précédente. En effet, dans leur forme la plus simple, les SPs peuvent être utilisés comme indicateur de changement d'indice de réfraction ou d'épaisseur de films organiques adsorbés aux surfaces métalliques en utilisant les mesures de réflectivité SPR[58].

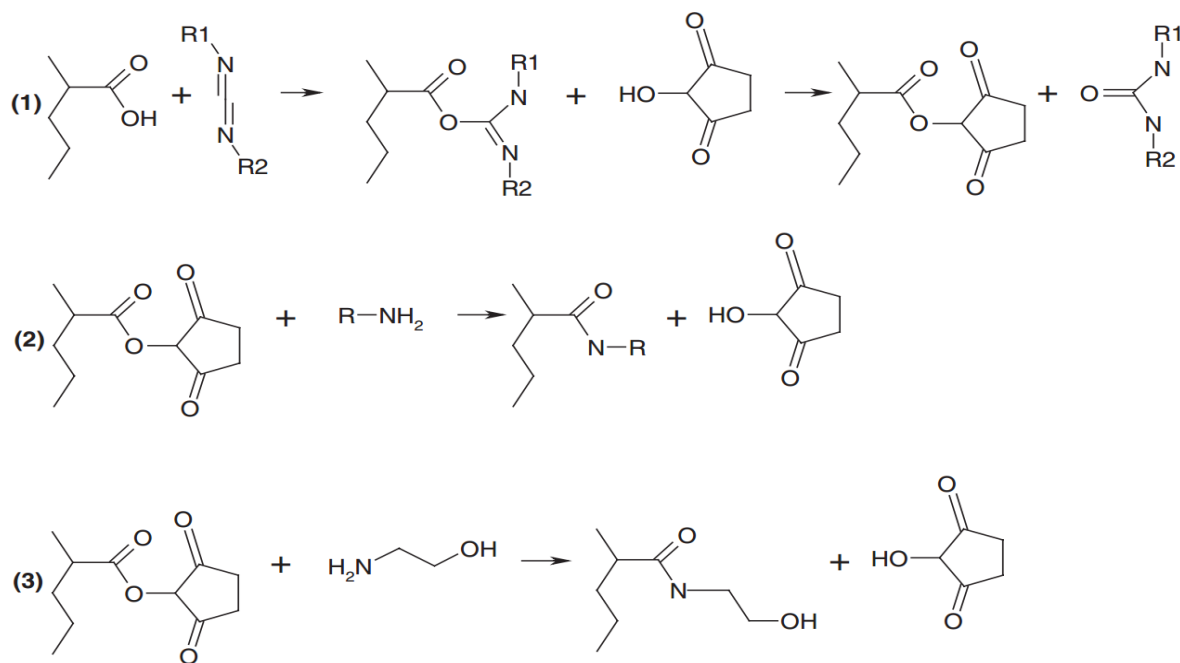


Figure 1-11 Réaction chimique impliquée dans un couplage EDC/NSH

Un acide carboxylique est d'abord activé avec l'EDC ($\text{R}_1\text{-N}=\text{N-R}_2$) suivi du NHS à l'étape 1 pour donner un intermédiaire activé. Suivra la formation d'une liaison covalente avec la cible par une amine primaire à l'étape 2. Les intermédiaires restants sont désactivés avec de l'éthanolamine à l'étape 3. Dans ce schéma, R peut représenter une protéine ou une petite molécule comme un peptide ou un médicament. R_1 est $\text{-CH}_2\text{CH}_3$ et R_2 est $\text{-(CH}_2\text{)}_3\text{N}^+\text{H(CH}_3\text{)}_2\text{Cl}^-$ (figure reproduite de [59]).

La SPR est un phénomène qui se produit généralement à des surfaces d'or planaires et larges sur un prisme de verre. Cependant, le phénomène de la SPR peut également se produire sur des surfaces d'or non planaires aussi petites qu'une nanoparticule (NP). Dans le dernier cas, le phénomène SPR sera désigné par le terme LSPR (*Localized Surface Plasmon Resonance*), représentant un phénomène «localisé» de la SPR à une plus petite échelle de surface.

1.3.2. Les principes de la LSPR

La résonance des plasmons de surface localisés (LSPR) se base en grande partie sur les mêmes principes physiques que la SPR, avec quelques différences. Particulièrement, la LSPR est une expérience où des nanoparticules (NPs) métalliques sphériques sont utilisées à la place des surfaces métalliques. Ces NPs ont un diamètre beaucoup plus petit que la longueur d'onde de la lumière incidente[53]. Ainsi, lorsque la lumière incidente interagit avec les NPs, cela induira une oscillation collective des électrons libres en résonance avec l'oscillation du champ électrique (E) de la lumière (Figure 1-12) [64].

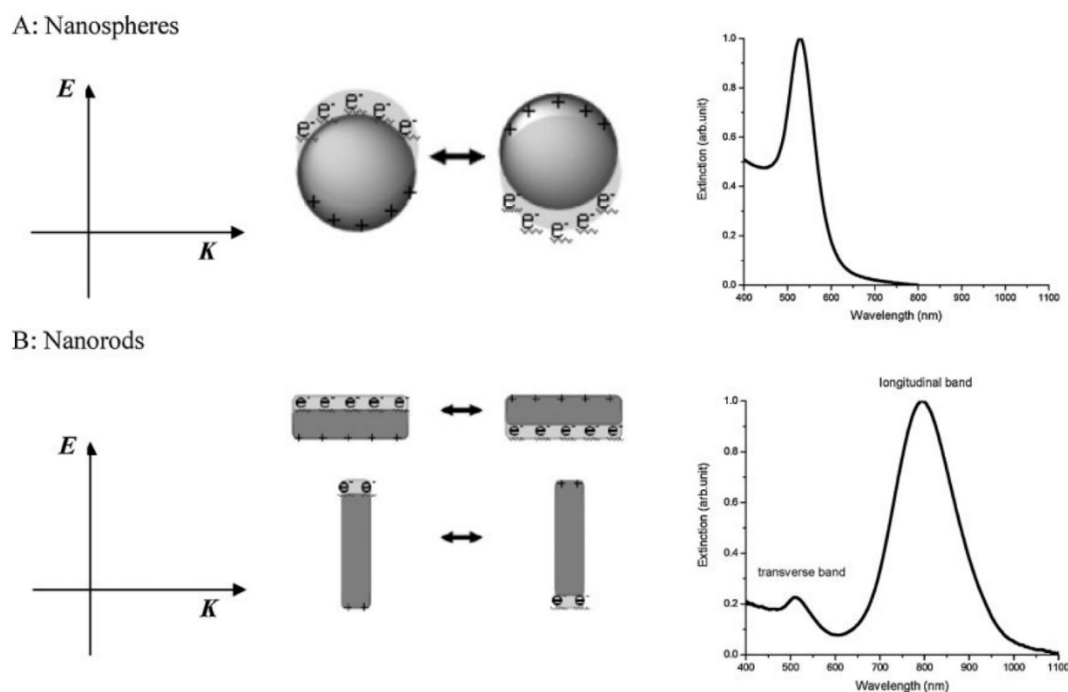


Figure 1-12 Propriétés physiques et optiques des NPs

Différence de l'oscillation du nuage électronique d'une NP avec le champ électrique E de la radiation plutôt qu'avec le champ magnétique K de la radiation pour des nanoparticules de type (A) nanosphériques et (B) nanobarres. Pour des nanoparticules non-sphériques, il y aura un mode d'oscillation (transversale ou longitudinale) en fonction de la morphologie/l'assymétrie de la NPs, ce qui résultera en un nombre différent de bandes maximales dans leur spectre d'absorbance (figure reproduite de[56]).

Ce phénomène de LSPR, semblable au phénomène observé dans la SPR, donnera lieu à une amplification du champ électrique local à la surface des NPs. Cette amplification résulte donc en une bande SPR avec une forte résonance au pic maximal. Les senseurs LSPR, typiquement des NPs d'or (AuNPs), dépendent des propriétés diélectriques locales associées à l'indice de réfraction (RI) du milieu environnant. Par conséquent, les NP sont sensibles à la dissociation des molécules à leur surface. Ces dissociations vont changer le RI du milieu local des NPs [56]. Par conséquent, les événements de liaison à la surface des NPs métalliques se traduisent en une variation de la longueur d'onde de la bande SPR maximale (λ_{\max}).

De cette manière, une relation est établie entre le déplacement de λ_{\max} avec les changements de RI induits par les événements de surface et la concentration du ligand liant la surface des NPs; ceci constitue la base de la détection en LSPR[65].

Puisque la LSPR repose sur les mêmes principes et phénomènes observables que la SPR, il en résulte que les sensogrammes LSPR sont semblables aux sensogrammes SPR, soit un signal du changement de λ_{SPR} en fonction du temps (ou du nombre de spectres acquis). Ainsi, tout comme en SPR, un événement de liaison à la surface des NPs est détecté comme étant un déplacement bathochromique de ($\Delta\lambda > 0$ nm), alors qu'un événement de dissociation donnera lieu à un déplacement hypsochromique de ($\Delta\lambda < 0$ nm)[42].

1.3.3. Les caractéristiques des AuNPs

Les nanoparticules (NPs) sont des nanostructures inorganiques ayant une taille variant de 10 à 500 nm[66]. Il existe deux classes de NPs : les conductrices ainsi que les semi-conductrices [67]. Les NPs peuvent être synthétisées selon deux approches, soit *bottom-up* (i.e. allant d'une structure plus petite à plus grande) ainsi que *top-down* (i.e. allant d'une structure plus grande à plus petite)[68-69]. Selon la méthode de synthèse utilisée, les NPs peuvent avoir différentes formes. En effet, les NPs peuvent être sous la forme de sphère, triangle, fil, trou, barre, prisme etc. (Figure 1-13[67]). Les propriétés optiques des NPs varient selon leur taille et leur composition [64, 67, 70].

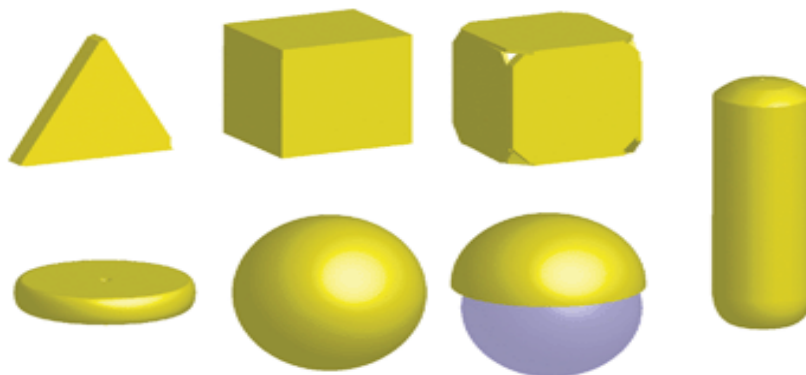


Figure 1-13 Les différentes morphologies possibles des NPs

Représentation simple de certaines géométries possibles pour les NPs selon les conditions de synthèse choisies (figure reproduite de [67]).

La synthèse *bottom-up* de NPs passe par trois étapes principales, soient la nucléation, la croissance et la maturation[71](Figure 1-14). La nucléation débute d'une part par la réduction de l'atome métallique chargé positivement (agissant comme germe ou nucléi) jusqu'à son état neutre et, d'autre part, par l'oxydation de l'agent réducteur appelé également agent stabilisant.

À l'état neutre, les atomes métalliques s'agrègent puisqu'ils n'ont pas de charge favorisant leur répulsion. Cela donne naissance à des noyaux (*seeds*). La nature de ce noyau joue un rôle déterminant sur les structures finales pouvant être atteintes par la synthèse. Ensuite, l'agent réducteur s'adsorbe à la surface des noyaux, sa nature dictant sa préférence pour certaines faces du nanocrystal. Ceci bloque certaines surfaces, favorisant l'addition d'atomes métalliques à d'autres surfaces, ce qui constitue l'étape de croissance. Enfin, à la maturation, il y aura une optimisation de la structure finale afin d'arriver à un équilibre entre la minimisation de l'énergie de surface de la NP ainsi que de la stabilisation de la NP[71]. La structure finale obtenue dépend donc du ratio de l'agent réducteur par rapport au métal réduit.

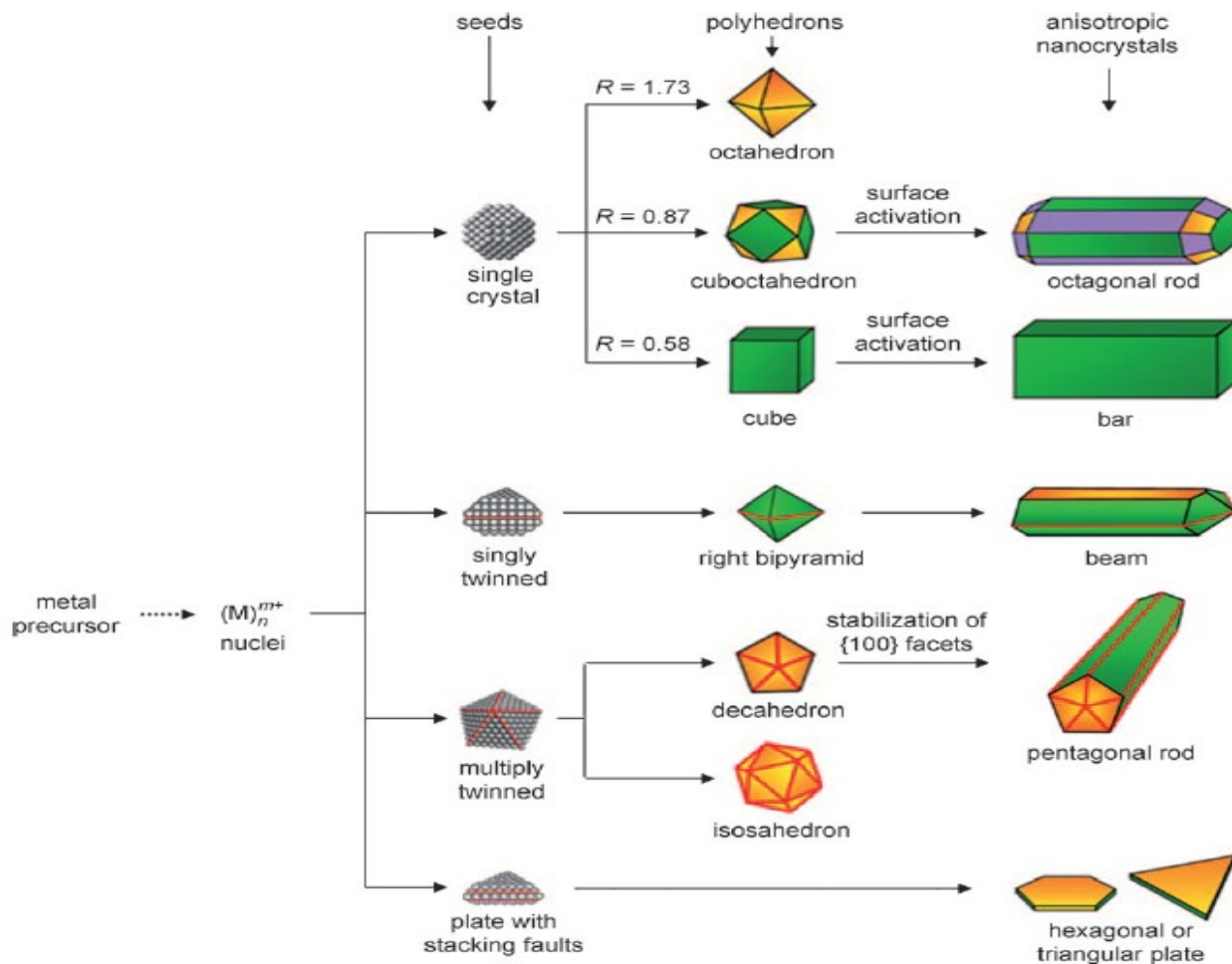


Figure 1-14 Différentes voies de réactions menant à des formes variées de nanocristaux

Figure reproduite de [71]

Le spectre d'absorbance UV-vis permet d'obtenir des informations qualitatives quant à la structure des NPs d'or (AuNPs). En effet, le nombre de pics d'absorbances sur le spectre permet de déterminer si les AuNPs ont une structure isotrope (un seul pic, donc sphérique) ou anisotrope (plus d'un pic, donc non-sphérique) (Figure 1-12). Ces différents pics sont dus au fait que les électrons disposés sur des faces de différentes longueurs n'auront pas une oscillation orientée de la même façon avec le champ électrique de la radiation incidente. Le champ électrique ressenti est alors différent, ce qui change l'énergie de résonance et donc la longueur d'onde observée pour un maximum d'absorbance[56].

Grâce à leurs propriétés optiques exceptionnelles et à la facilité de modifier leur chimie de surface, les AuNPs peuvent entre autres servir à l'imagerie médicale *in vivo* en tant qu'amplificateur de signal SERS (*Surface Enhanced Raman Spectroscopy*)[70]. Les AuNPs

peuvent également servir à la livraison de médicaments induite par excitation de la lumière ou même la photothérapie thermique pour le traitement de tumeurs[67].

Les molécules thiolées sont largement utilisées pour la fonctionnalisation des AuNPs[72]. Cela est possible puisque les agents stabilisants comme le citrate, les hydroxydes et les molécules chlorées peuvent être facilement substitués par élimination sur les groupements -SH pour former une monocouche auto-assemblée à la surface des AuNPs. Une AuNP fonctionnalisée par une molécule X est nommée X@AuNPs. ***Dans le cadre de ce mémoire, les AuNPs fonctionnalisées de manière non covalente et covalentes seront nommées X: AuNPs et X-AuNPs, respectivement.***

Dans le domaine de la biodétection, les AuNPs s'avèrent particulièrement intéressantes en tant qu'amplificateurs de signaux SPR[53]. Par exemple, des AuNPs utilisées conjointement avec la SPR permettent d'augmenter de 6 fois la sensibilité de la méthode pour la détection de biomarqueurs d'anticorps pour le diagnostic du cancer de la prostate[73].

Comme autre exemple, les AuNPs fonctionnalisées de façon non covalente à l'acide folique (FA: AuNPs) ont été utilisées pour la quantification du MTX dans les échantillons cliniques de patients subissant la chimiothérapie au MTX pour le cancer [65]. Dans cette application, les AuNPs servent de compétiteurs au MTX pour la cible hDHFR, où la compétition peut être observée en LSPR[65], tout en amplifiant le signal afin d'augmenter significativement la limite de détection du MTX dans les échantillons de sérum[63].

La quantification d'une petite molécule telle le MTX impliquant une compétition entre des FA: AuNPs et la hDHFR, tant en LSPR qu'en SPR, démontre le potentiel de ces AuNPs pour la biodétection impliquant la DHFR R67. En effet, puisque l'FA est un ligand connu de la DHFR R67 (voir le Tableau 1-1), il serait possible d'impliquer les FA@AuNPs dans une compétition avec des inhibiteurs potentiels de cette cible. Si une compétition est observée, ceci permet le développement d'une plateforme de criblage de la DHFR R67 pour l'identification de nouveaux inhibiteurs. Une telle plateforme pourrait faciliter l'étape de criblage préliminaire dans le processus de développement de médicaments en utilisant une méthode rapide (réponse en 30 min) et peu coûteuse (peu de matériel nécessaire pour l'analyse).

1.4. L'objectif du projet de recherche

L'objectif du projet de recherche consiste à développer une méthode de criblage en SPR en vue de faciliter la caractérisation des inhibiteurs de la DHFR R67.

Pour y parvenir, le projet est divisé en deux grandes phases, soit dans un premier temps la détermination des conditions de criblage (Chapitre 2), puis dans un deuxième temps, la détermination de la configuration des acteurs à adopter sur la plateforme SPR (Chapitre 3).

La première phase du projet permet de définir les conditions optimales à utiliser pendant les différentes étapes du développement de la plateforme de criblage. En effet, pour pouvoir cribler, il est essentiel d'assurer d'abord la solubilité des composés à cribler tout en maintenant une activité et une intégrité suffisante de la cible biologique. Les méthodes utilisées pour déterminer ces conditions comprennent entre autres des tests de solubilités des inhibiteurs (μM - mM), d'activités enzymatiques (% d'activités) et d'inhibition (IC_{50}). En plus, pour mieux comprendre l'effet des co-solvants à utiliser sur la diminution de l'activité des enzymes DHFR R67 et hDHFR, des tests supplémentaires d'efficacité catalytique ($k_{\text{cat}}/K_{\text{M}}$) et de thermostabilité (T_{m}) des deux enzymes seront rapportés.

Une fois les conditions optimales déterminées, ces conditions seront utilisées dans la deuxième phase du projet, qui consiste à développer un essai compétitif en SPR impliquant la DHFR R67 et ses inhibiteurs. L'essai compétitif a été testé selon deux approches différentes (Figure 1-15) : avec des AuNPs (Approche A), ou sans AuNPs (Approche B).

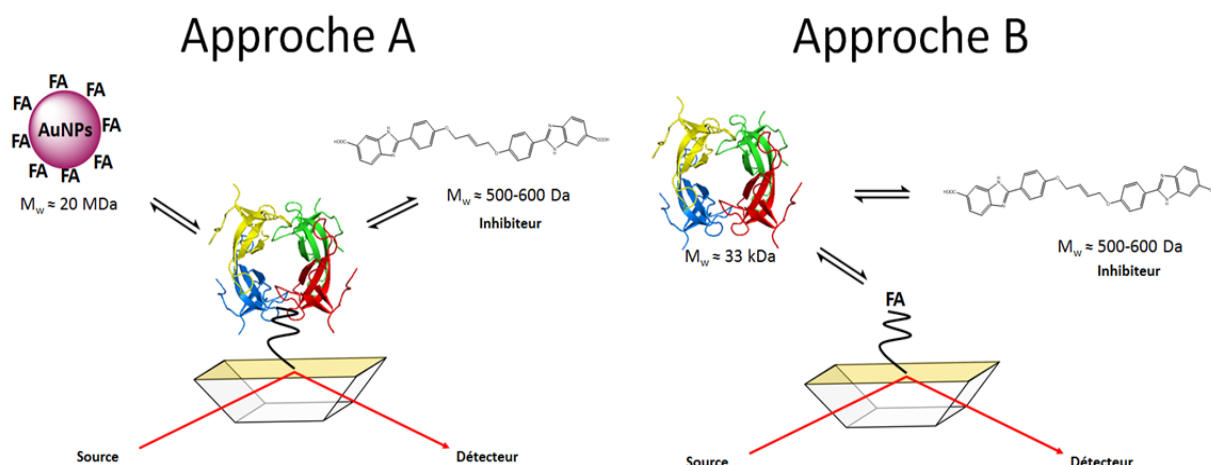


Figure 1-15 Les deux approches considérées pour le développement d'une plateforme de criblage d'inhibiteurs de la DHFR R67

L'approche A consiste à observer le signal SPR généré par la compétition entre des FA:AuNP libres en solution comme amplificateurs de signaux SPR (compétiteur 1) et un inhibiteur potentiel libre en solution (compétiteur 2) pour le site actif de la DHFR R67 immobilisée (cible) sur un prisme d'or. L'approche B consiste à observer le signal SPR généré par la compétition entre l'inhibiteur potentiel libre en solution (compétiteur 1) et l'FA immobilisée à la surface d'or du prisme (compétiteur 2) pour le site actif de la DHFR R67 immobilisée (cible) libre en solution.

Afin de développer une méthode efficace de compétition impliquant des FA:AuNPs (Approche A), il est essentiel de vérifier si elles donnent lieu à des interactions non-spécifiques avec le second compétiteur (inhibiteur criblé), et que la compétition soit possible avec la cible (DHFR R67). Ces vérifications seront effectuées via des expériences cinétiques en LSPR (Figure 1-16). Ainsi, si la DHFR R67 lie les FA:AuNPs, cela induira un changement dans l'environnement diélectrique local des FA:AuNPs. Cette perturbation sera donc observée sous la forme d'un déplacement de λ_{LSPR} des FA:AuNPs tel que vu dans le cas de la hDHFR[65].

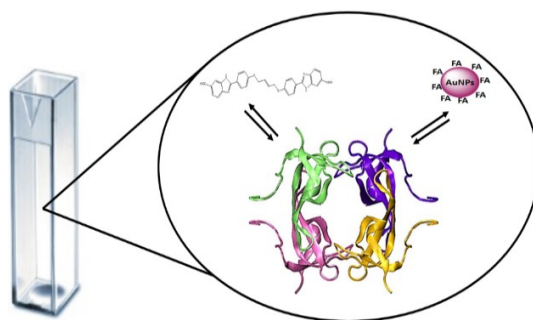


Figure 1-16 Les acteurs impliqués lors des expériences contrôles en LSPR pour l'approche A

Les expériences LSPR consistent à observer le signal SPR généré par la liaison ou le déplacement des FA :AuNPs (compétiteur 1) avec le site actif de la DHFR R67 (cible) par l'inhibiteur (compétiteur 2). Les trois acteurs sont donc tous libres en solution. Ces cinétiques LSPR sont essentiels pour valider la faisabilité de l'approche A.

Si le concept d'une plateforme de criblage en SPR est validé dans le cas de l'enzyme DHFR R67, ce concept pourrait être étendu à d'autres cibles enzymatiques. Cela permettrait l'accélération de la découverte de nouveaux inhibiteurs pour diverses maladies.

1.5. Références (Chapitre 1)

1. Debabov, D., Antibiotic Resistance: Origins, Mechanisms, Approaches to Counter. *Appl Biochem Microbiol* **2013**, 49 (8), 665-671.
2. Pasteur, L., Remarks on Anthracic Vaccination as a Prophylactic of Splenic Fever. *Br Med J* **1882**, 1 (1110), 489-489.
3. Fleming, A., On the Antibacterial Action of Cultures of a Penicillium, with Special Reference to their Use in the Isolation of B. influenzae. *Br J Exp Pathol* **1929**, 10 (3), 226-236.
4. Bax, R.; Griffin, D., Introduction to Antibiotic Resistance. In *Antibiotic Resistance*, Springer: Berlin, Heidelberg, 2012; pp 1-12.
5. Lin, J.; Nishino, K.; Roberts, M. C.; Tolmasky, M.; Aminov, R. I.; Zhang, L. X., Mechanisms of antibiotic resistance. *Front Microbiol* **2015**, 6.
6. National action plan for combating antibiotic-resistance bacteria. U.S. White House: Washington D.C., 2015; pp 1-6.
7. Life expectancy increased by 5 years since 2000, but health inequalities persist. World Health Organization (WHO): France, 2016; pp 1-14.
8. Keeling, P. J.; Palmer, J. D., Horizontal gene transfer in eukaryotic evolution. *Nat Rev Genet* **2008**, 9 (8), 605-618.
9. Bastien, D.; Ebert, M. C. C. J. C.; Forge, D.; Toulouse, J.; Kadnikova, N.; Perron, F.; Mayence, A.; Huang, T. L.; Vanden Eynde, J. J.; Pelletier, J. N., Fragment-Based Design of Symmetrical Bis-benzimidazoles as Selective Inhibitors of the Trimethoprim-Resistant, Type II R67 Dihydrofolate Reductase. *J Med Chem* **2012**, 55 (7), 3182-3192.
10. Hao, H.; Cheng, G.; Iqbal, Z.; Ai, X.; Hussain, H. I.; Huang, L.; Dai, M.; Wang, Y.; Liu, Z.; Yuan, Z., Benefits and risks of antimicrobial use in food-producing animals. *Front Microbiol* **2014**, 5, 288.
11. Vieira, A. R.; Collignon, P.; Aarestrup, F. M.; McEwen, S. A.; Hendriksen, R. S.; Hald, T.; Wegener, H. C., Association Between Antimicrobial Resistance in Escherichia coli Isolates from Food Animals and Blood Stream Isolates from Humans in Europe: An Ecological Study. *Foodborne Pathog Dis* **2011**, 8 (12), 1295-1301.
12. Fleming-Dutra, K. E.; Hersh, A. L.; Shapiro, D. J.; Bartoces, M.; Enns, E. A.; File, T. M.; Finkelstein, J. A.; Gerber, J. S.; Hyun, D. Y.; Linder, J. A.; Lynfield, R.; Margolis, D. J.; May, L. S.; Merenstein, D.; Metlay, J. P.; Newland, J. G.; Piccirillo, J. F.; Roberts, R. M.; Sanchez, G. V.; Suda, K. J.; Thomas, A.; Woo, T. M.; Zetts, R. M.; Hicks, L. A., Prevalence of Inappropriate Antibiotic Prescriptions Among US Ambulatory Care Visits, 2010-2011. *JAMA* **2016**, 315 (17), 1864-1873.
13. Baym, M.; Stone, L. K.; Kishony, R., Antibiotic resistance : Multidrug evolutionary strategies to reverse antibiotic resistance. *Science* **2016**, 351 (6268), 40-U46.

14. Shapiro, D. J.; Hicks, L. A.; Pavia, A. T.; Hersh, A. L., Antibiotic prescribing for adults in ambulatory care in the USA, 2007–09. *J Antimicrob Chemother* **2014**, *69* (1), 234-240.
15. O'Neil, J., Tackling Drug-Resistant Infections Globally: final report and recommendations. UK Department of Health: United Kingdom (UK), 2016; pp 1-37.
16. Fleming, M. P.; Datta, N.; Grüneberg, R. N., Trimethoprim Resistance determined by R Factors. *Br Med J* **1972**, *1* (5802), 726-728.
17. Pattishall, K. H.; Acar, J.; Burchall, J. J.; Goldstein, F. W.; Harvey, R. J., Two distinct types of trimethoprim-resistant dihydrofolate reductase specified by R-plasmids of different compatibility groups. *J Biol Chem* **1977**, *252* (7), 2319-23.
18. Huovinen, P., Trimethoprim resistance. *Antimicrob Agents Chemother* **1987**, *31* (10), 1451-1456.
19. Heikkilä, A. M.; Nousiainen, J. I.; Pyörälä, S., Costs of clinical mastitis with special reference to premature culling. *J Dairy Sci* **2012**, *95* (1), 139-150.
20. Howell, E. E., Searching Sequence Space: Two Different Approaches to Dihydrofolate Reductase Catalysis. *ChemBioChem* **2005**, *6* (4), 590-600.
21. Schnell, J. R.; Dyson, H. J.; Wright, P. E., Structure, dynamics, and catalytic function of dihydrofolate reductase. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* **2004**, *33*, 119-140.
22. Park, H. Y.; Zhuang, P.; Nichols, R.; Howell, E. E., Mechanistic studies of R67 dihydrofolate reductase - Effects of pH and an H62C mutation. *J Biol Chem* **1997**, *272* (4), 2252-2258.
23. Spina, M.; Cuccioloni, M.; Mozzicafreddo, M.; Montecchia, F.; Pucciarelli, S.; Eleuteri, A. M.; Fioretti, E.; Angeletti, M., Mechanism of inhibition of wt-dihydrofolate reductase from *E. coli* by tea epigallocatechin-gallate. *Proteins: Struct, Funct, Bioinf* **2008**, *72* (1), 240-251.
24. Schweitzer, B. I.; Dicker, A. P.; Bertino, J. R., Dihydrofolate reductase as a therapeutic target. *FASEB J* **1990**, *4* (8), 2441-52.
25. Jackson, M.; Chopra, S.; Smiley, R. D.; Maynard, P. O. N.; Rosowsky, A.; London, R. E.; Levy, L.; Kalman, T. I.; Howell, E. E., Calorimetric Studies of Ligand Binding in R67 Dihydrofolate Reductase. *Biochemistry* **2005**, *44* (37), 12420-12433.
26. Smith, S. L.; Stone, D.; Novak, P.; Baccanari, D. P.; Burchall, J. J., R plasmid dihydrofolate reductase with subunit structure. *J Biol Chem* **1979**, *254* (14), 6222-5.
27. Bhabha, G.; Ekiert, D. C., Divergent evolution of protein conformational dynamics in dihydrofolate reductase. *Nat Struct Mol Biol* **2013**, *20* (11), 1-25.
28. Sawaya, M. R.; Kraut, J., Loop and Subdomain Movements in the Mechanism of *Escherichia coli* Dihydrofolate Reductase: Crystallographic Evidence. *Biochemistry* **1997**, *36* (3), 586-603.
29. Narayana, N.; Matthews, D. A.; Howell, E. E.; Xuong, N.-h., A plasmid-encoded dihydrofolate reductase from trimethoprim-resistant bacteria has a novel D2-symmetric active site. *Nat Struct Mol Biol* **1995**, *2* (11), 1018-1025.
30. Tuttle, L. M.; Dyson, H. J.; Wright, P. E., Side Chain Conformational Averaging in Human Dihydrofolate Reductase. *Biochemistry* **2014**, *53* (7), 1134-1145.
31. Ebert, M. C. C. J. C.; Morley, K. L.; Volpato, J. P.; Schmitzer, A. R.; Pelletier, J. N., Asymmetric mutations in the tetrameric R67 dihydrofolate reductase reveal high tolerance to active-site substitutions. *Protein Sci* **2015**, *24* (4), 495-507.

32. Cody, V.; Pace, J.; Makin, J.; Piraino, J.; Queener, S. F.; Rosowsky, A., Correlations of Inhibitor Kinetics for Pneumocystis jirovecii and Human Dihydrofolate Reductase with Structural Data for Human Active Site Mutant Enzyme Complexes. *Biochemistry* **2009**, *48* (8), 1702-1711.
33. Bailey, S. W.; Ayling, J. E., The extremely slow and variable activity of dihydrofolate reductase in human liver and its implications for high folic acid intake. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* **2009**, *106* (36), 15424-15429.
34. Huovinen, P., Minireview : Trimethoprim Resistance. *Antimicrob Agents Chemother* **1987**, *31* (10), 1451-1456.
35. Matthews, D. A.; Bolin, J. T.; Burrige, J. M.; Filman, D. J.; Volz, K. W.; Kraut, J., Dihydrofolate reductase. The stereochemistry of inhibitor selectivity. *J Biol Chem* **1985**, *260* (1), 392-399.
36. Broad, D. F.; Smith, J. T., Classification of trimethoprim-resistant dihydrofolate reductases mediated by R-plasmids using isoelectric focussing. *Eur J Biochem* **1982**, *125* (3), 617-22.
37. Kamath, G.; Howell, E. E.; Agarwal, P. K., The Tail Wagging the Dog: Insights into Catalysis in R67 Dihydrofolate Reductase. *Biochemistry* **2010**, *49* (42), 9078-9088.
38. Krahn, J. M.; Jackson, M. R.; DeRose, E. F.; Howell, E. E.; London, R. E., Crystal structure of a type II dihydrofolate reductase catalytic ternary complex. *Biochemistry* **2007**, *46* (51), 14878-14888.
39. Bradrick, T. D.; Beechem, J. M.; Howell, E. E., Unusual Binding Stoichiometries and Cooperativity Are Observed during Binary and Ternary Complex Formation in the Single Active Pore of R67 Dihydrofolate Reductase, a D2 Symmetric Protein. *Biochemistry* **1996**, *35* (35), 11414-11424.
40. Hughes, J. P.; Rees, S.; Kalindjian, S. B.; Philpott, K. L., Principles of early drug discovery. *Br J Pharmacol* **2011**, *162* (6), 1239-1249.
41. Beutler, J. A., Natural Products as a Foundation for Drug Discovery. *Curr Protoc Pharmacol* **2009**, *46*, 9.11.1-9.11.21.
42. Ciulli, A., Biophysical Screening for the Discovery of Small-Molecule Ligands. In *Protein-Ligand Interactions: Methods and Applications*, Humana Press: Totowa, NJ, 2013; pp 357-388.
43. Blass, B. E., Chapter 1 - Drug Discovery and Development: An Overview of Modern Methods and Principles. In *Basic Principles of Drug Discovery and Development*, Academic Press: Boston, 2015; pp 1-34.
44. Cooper, M. A., Optical biosensors in drug discovery. *Nat Rev Drug Discov* **2002**, *1* (7), 515-528.
45. Blass, B. E., Chapter 4 - In vitro Screening Systems. In *Basic Principles of Drug Discovery and Development*, Academic Press: Boston, 2015; pp 143-202.
46. Christopeit, T.; Carlsen, T. J. O.; Helland, R.; Leiros, H.-K. S., Discovery of Novel Inhibitor Scaffolds against the Metallo- β -lactamase VIM-2 by Surface Plasmon Resonance (SPR) Based Fragment Screening. *J Med Chem* **2015**, *58* (21), 8671-8682.
47. Baughman, B. M.; Wang, H.; An, Y.; Kireev, D.; Stashko, M. A.; Jessen, H. J.; Pearce, K. H.; Frye, S. V.; Shears, S. B., A High-Throughput Screening-Compatible Strategy for the Identification of Inositol Pyrophosphate Kinase Inhibitors. *PLoS One* **2016**, *11* (10), e0164378.

48. Shepherd, C. A.; Hopkins, A. L.; Navratilova, I., Fragment screening by SPR and advanced application to GPCRs. *Prog Biophys Mol Biol* **2014**, *116* (2–3), 113-123.
49. Guo, Y.; Ye, J. Y.; Divin, C.; Huang, B.; Thomas, T. P.; Baker, J. R.; Norris, T. B., Real-Time Biomolecular Binding Detection Using a Sensitive Photonic Crystal Biosensor. *Anal Chem* **2010**, *82* (12), 5211-5218.
50. Copeland, R. A., Assay Considerations for Compound Library Screening. In *Evaluation of Enzyme Inhibitors in Drug Discovery*, John Wiley & Sons, Inc.: 2013; pp 123-168.
51. Ma, A.; Yu, W.; Li, F.; Bleich, R. M.; Herold, J. M.; Butler, K. V.; Norris, J. L.; Korboukh, V.; Tripathy, A.; Janzen, W. P.; Arrowsmith, C. H.; Frye, S. V.; Vedadi, M.; Brown, P. J.; Jin, J., Discovery of a Selective, Substrate-Competitive Inhibitor of the Lysine Methyltransferase SETD8. *J Med Chem* **2014**, *57* (15), 6822-6833.
52. Regnström, K.; Yan, J.; Nguyen, L.; Callaway, K.; Yang, Y.; Diep, L.; Xing, W.; Adhikari, A.; Beroza, P.; Hom, R. K.; Riley, B.; Rudolph, D.; Jobling, M. F.; Baker, J.; Johnston, J.; Konradi, A.; Bova, M. P.; Artis, R. D., Label Free Fragment Screening Using Surface Plasmon Resonance as a Tool for Fragment Finding – Analyzing Parkin, a Difficult CNS Target. *PLoS One* **2013**, *8* (7), e66879.
53. Pires, N. M. M.; Dong, T.; Hanke, U.; Hoivik, N., Recent Developments in Optical Detection Technologies in Lab-on-a-Chip Devices for Biosensing Applications. *Sensors* **2014**, *14* (8), 15458-15479.
54. Yanase, Y.; Hiragun, T.; Ishii, K.; Kawaguchi, T.; Yanase, T.; Kawai, M.; Sakamoto, K.; Hide, M., Surface Plasmon Resonance for Cell-Based Clinical Diagnosis. *Sensors* **2014**, *14* (3), 4948.
55. Puiu, M.; Bala, C., SPR and SPR Imaging: Recent Trends in Developing Nanodevices for Detection and Real-Time Monitoring of Biomolecular Events. *Sensors* **2016**, *16* (6), 870.
56. Huang, X.; Neretina, S.; El-Sayed, M. A., Gold Nanorods: From Synthesis and Properties to Biological and Biomedical Applications. *Adv Mater* **2009**, *21* (48), 4880-4910.
57. Homola, J., Electromagnetic Theory of Surface Plasmons. In *Surface Plasmon Resonance Based Sensors*, Springer: Berlin, Heidelberg, 2006; pp 3-44.
58. Brockman, J. M.; Nelson, B. P.; Corn, R. M., Surface plasmon resonance imaging measurements of ultrathin organic films. *Annu Rev Phys Chem* **2000**, *51* (1), 41-63.
59. Fischer, M. J. E., Amine Coupling Through EDC/NHS: A Practical Approach. In *Surface Plasmon Resonance: Methods and Protocols*, Humana Press: Totowa, NJ, 2010; pp 55-73.
60. Optics, E. Introduction to polarization.
<https://www.edmundoptics.com/resources/application-notes/optics/introduction-to-polarization/> (accessed on June 22th, 2017).
61. Knoll, W., Interfaces and thin films as seen by bound electromagnetic waves. *Annu Rev Phys Chem* **1998**, *49* (1), 569-638.
62. Spoto, G.; Minunni, M., Surface Plasmon Resonance Imaging: What Next? *J Phys Chem Lett* **2012**, *3* (18), 2682-2691.
63. Zhao, S. S.; Bukar, N.; Toulouse, J. L.; Pelechacz, D.; Robitaille, R.; Pelletier, J. N.; Masson, J.-F., Miniature multi-channel SPR instrument for methotrexate monitoring in clinical samples. *Biosens Bioelectron* **2015**, *64*, 664-670.
64. Huang, X.; El-Sayed, M. A., Gold nanoparticles: Optical properties and implementations in cancer diagnosis and photothermal therapy. *J Adv Res* **2010**, *1* (1), 13-28.

65. Zhao, S. S.; Bichelberger, M. A.; Colin, D. Y.; Robitaille, R.; Pelletier, J. N.; Masson, J.-F., Monitoring methotrexate in clinical samples from cancer patients during chemotherapy with a LSPR-based competitive sensor. *Analyst* **2012**, *137* (20), 4742-4750.
66. Mody, V. V.; Siwale, R.; Singh, A.; Mody, H. R., Introduction to metallic nanoparticles. *J Pharm Bioallied Sci* **2010**, *2* (4), 282-289.
67. Doane, T. L.; Burda, C., The unique role of nanoparticles in nanomedicine: imaging, drug delivery and therapy. *Chem Soc Rev* **2012**, *41* (7), 2885-2911.
68. Wang, Y.; Xia, Y., Bottom-Up and Top-Down Approaches to the Synthesis of Monodispersed Spherical Colloids of Low Melting-Point Metals. *Nano Lett* **2004**, *4* (10), 2047-2050.
69. Brust, M.; Kiely, C. J., Some recent advances in nanostructure preparation from gold and silver particles: a short topical review. *Colloids Surf A Physicochem Eng Asp* **2002**, *202* (2-3), 175-186.
70. Yeh, Y.-C.; Czeran, B.; Rotello, V. M., Gold nanoparticles: preparation, properties, and applications in bionanotechnology. *Nanoscale* **2012**, *4* (6), 1871-1880.
71. Xia, Y.; Xiong, Y.; Lim, B.; Skrabalak, S. E., Shape-Controlled Synthesis of Metal Nanocrystals: Simple Chemistry Meets Complex Physics? *Angew Chem Int Edit* **2009**, *48* (1), 60-103.
72. Love, J. C.; Estroff, L. A.; Kriebel, J. K.; Nuzzo, R. G.; Whitesides, G. M., Self-Assembled Monolayers of Thiolates on Metals as a Form of Nanotechnology. *Chem Rev* **2005**, *105* (4), 1103-1170.
73. Uludag, Y.; Tothill, I. E., Cancer Biomarker Detection in Serum Samples Using Surface Plasmon Resonance and Quartz Crystal Microbalance Sensors with Nanoparticle Signal Amplification. *Anal Chem* **2012**, *84* (14), 5898-5904.

Chapitre 2 - Détermination des conditions de criblage de la DHFR R67 et de la hDHFR

2.1. Préface

Le présent chapitre comprend l'article intitulé « *Investigation of Classical Organic and Ionic Liquid Cosolvents for Early-Stage Screening in Fragment-Based Inhibitor Design with Unrelated Bacterial and Human Dihydrofolate Reductases* ». Cet article présente la détermination des conditions optimales pour le criblage d'inhibiteurs de l'enzyme DHFR R67 en tant que cible et de l'enzyme hDHFR en tant que contrôle. Afin d'assurer un développement efficace d'une plateforme de criblage en SPR pour la DHFR R67, cet article permet d'établir les conditions propices à la préservation de l'intégrité des enzymes et des composés à cribler.

L'article a été soumis pour publication le 5 décembre 2016, accepté le 23 mars 2017 puis publié («*ahead of print*») le 20 avril 2017 dans le journal *ASSAY and Drug Development Technologies*.

La première auteure, Jacynthe L. Toulouse, est une étudiante au doctorat au programme de Biochimie et médecine moléculaire. Sa contribution à l'article comprend l'exécution et l'interprétation des expériences d'inhibition (IC_{50}), de solubilité et de DSF (T_m) et de tests d'activité supplémentaires (voir Annexe, Section A) ainsi que la rédaction et la révision de l'article. En tant que seconde auteure, j'ai déterminé les paramètres cinétiques enzymatiques (K_M , k_{cat} , k_{cat}/K_M) et effectué des tests d'activité supplémentaires (voir Annexe, Section A), et offert une contribution significative à la rédaction et à la révision de l'article. Natalia Kadnikova et Dominic Bastien exécutèrent les tests d'activité enzymatiques préliminaires. Vincent Gauchot a entrepris la synthèse de liquides ioniques sous la direction de Prof. Andreea R. Schmitzer. Le projet fut conçu et l'article rédigé sous la direction de Prof. Joelle N. Pelletier. Finalement, l'article a été formaté afin de conserver une cohérence entre l'article et l'ensemble du mémoire.

DOI : 10.1089/adt.2016.768

2.2. Article

INVESTIGATION OF CLASSICAL ORGANIC AND IONIC LIQUID COSOLVENTS FOR EARLY-STAGE SCREENING IN FRAGMENT-BASED INHIBITOR DESIGN WITH UNRELATED BACTERIAL AND HUMAN DIHYDROFOLATE REDUCTASES

Jacynthe L. Toulouse^{1,2,3}, Sarah M. J. Abraham^{2,3,4}, Natalia Kadnikova^{2,3,4}, Dominic Bastien^{1,2,3}, Vincent Gauchot^{2,4}, Andreea R. Schmitzer^{2,4}, Joelle N. Pelletier^{1,2,3,4,*}

¹Département de biochimie, Université de Montréal, C.P. 6128, Succ. Centre-ville Montréal, QC H3C 3J7, Canada

²CGCC, the Center in Green Chemistry and Catalysis, Montréal, QC Canada

³PROTEO, the Québec Network for Protein Function, Structure and Engineering, Québec, QC, Canada

⁴Département de chimie, Université de Montréal, C.P. 6128, Succ. Centre-ville Montréal, QC H3C 3J7, Canada

Running title: Cosolvents screening with unrelated enzymes.

* Corresponding author at: Department of Chemistry, University of Montreal, C.P. 6128, Succ. Centre-ville, Montreal, Quebec H3C 3J7, Canada. Telephone: 514-343-2124. Fax: 514-343-7586. E-mail: joelle.pelletier@umontreal.ca.

Keywords: Ionic liquid, organic cosolvent, inhibitor screening conditions, human dihydrofolate reductase, bacterial R67 dihydrofolate reductase

2.2.1. SUMMARY

Drug design by methods such as fragment screening requires effective solubilisation of millimolar concentrations of small organic compounds while maintaining the properties of the biological target. We investigate four organic solvents and three 1-butyl-3-methylimidazolium (BMIm)-based ionic liquids (ILs) as cosolvents to establish conditions for screening two structurally unrelated dihydrofolate reductases (DHFR) that are prime drug targets. Moderate concentrations (10-15%) of cosolvents had little effect on the inhibition of the microbial type II R67 DHFR and of human DHFR (hDHFR) while higher concentrations of organic cosolvents generally decreased activity of both DHFRs. In contrast, a specific IL conserved the activity of one DHFR while severely reducing the activity of the other, and vice-versa, illustrating the differing effect of ILs on distinct protein folds. Most of the cosolvents investigated preserved the fold of R67 DHFR and had little effect on binding of the cofactor NADPH but reduced the productive affinity for its substrate. In contrast, cosolvents resulted in modest structural destabilization of hDHFR with little effect on the productive affinity. We conclude that the organic cosolvents MeOH, DMF and DMSO offer the most balanced conditions for early stage compound screening as they maintain sufficient biological activity of both DHFRs while allowing for compound dissolution in the millimolar range. However, IL cosolvents showed poor capacity to solubilize organic compounds at millimolar concentrations, mitigating their utility in early stage screening. Nonetheless, ILs could procure an alternative to classical organic cosolvents when low concentrations of inhibitors are used, as when characterizing higher affinity inhibitors.

Abbreviations: Dihydrofolate reductase, DHFR; human DHFR, hDHFR; 1-butyl-3-methylimidazolium, BMIm; ionic liquids, ILs; trimethoprim, TMP; methotrexate, MTX; pemetrexed, PMTX; acetonitrile, ACN; dimethylformamide, DMF; dimethylsulfoxide, DMSO; methanol, MeOH; differential scanning fluorometry, DSF.

2.2.2. INTRODUCTION

Screening for inhibitors can be challenging when the biological target is water-soluble and the test compounds are hydrophobic. A decisive factor in choosing a cosolvent for inhibitor screening is its capacity to solubilize compounds at the mM concentrations required to make up stock solutions. This is particularly important during early stage screening where hits are likely to be weak inhibitors with IC_{50} in the high μ M to mM range, thus requiring that high compound concentrations be assayed. This was the case in our recent report of the first effort towards the identification of inhibitors against the plasmid-encoded type II R67 dihydrofolate reductase (R67 DHFR), an emerging source of microbial trimethoprim (TMP) resistance[1-2]. We identified bisbenzimidazole-type compounds with low mM to low μ M IC_{50} for R67 DHFR, the latter of which are exemplified by 2,2'-[1,5-pentanediy]bis(4-oxyphenylene)-bis-1H-benzimidazole-5-carboxylic acid (molecule **1**) and 2'-(4,4'-(2-hydroxypropane-1,3-diyl)-bis-(4-oxyphenylene)-bis-1H-benzimidazole-5-carboxylic acid (molecule **2**) (Figure 2-1)[1]. Although we previously applied 10% dimethylsulfoxide (DMSO) to screen >100 test compounds against R67 DHFR, those conditions proved moderately satisfactory as only 30% enzyme activity was retained under those conditions[1]. DMSO provided adequate compound solubilisation yet has been shown to weaken binding of one of the substrates, the dihydrofolate (DHF) to both R67 DHFR as well as *E. coli* DHFR[3-4] and may thus also interfere with the inhibitor binding.

DHFRs are ubiquitous targets for fighting proliferative diseases such as cancer and infectious diseases. Indeed, methotrexate (MTX) and pemetrexed (PMTX) (Figure 2-1) are among the most commonly used anticancer drugs where they inhibit human DHFR (hDHFR)[5], and the antibiotic TMP is used world-wide in the treatment of bacterial infections, selectively targeting bacterial chromosomal DHFRs[2]. As a result, DHFRs are long-standing targets for inhibitor development, including recent development of multi-target inhibitors of hDHFR and further key enzymes to improve cancer chemotherapy regimens by obtaining synergetic toxicities and simplifying pharmacokinetic profiles[6-9].

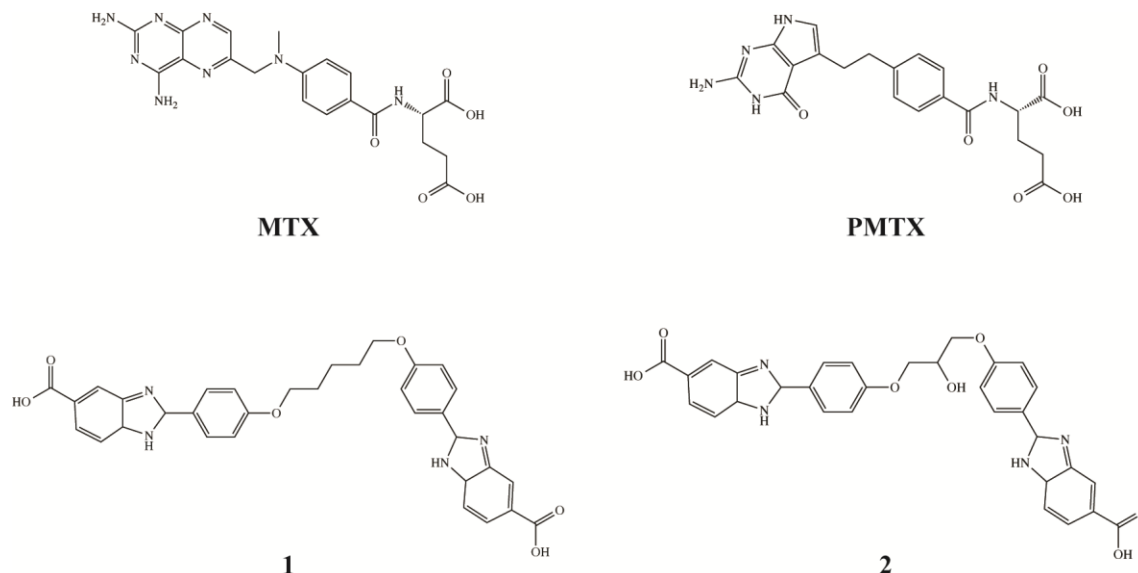


Figure 2-1 Structures of R67 DHFR and hDHFR inhibitors.

Methotrexate (MTX) is a tight binding inhibitor of hDHFR. Pemetrexed (PMTX) is not selective and inhibits both DHFRs. 1 (2,2'-[1,5-pentanediyloxybis(4-oxyphenylene)]-bis-1H-benzimidazole-5-carboxylic acid) and 2 (2'-(4,4'-(2-hydroxypropane-1,3-diyl)-bis-(4-oxyphenylene))-bis-1H-benzimidazole-5-carboxylic acid) are inhibitors of R67 DHFR[1].

Chromosomal DHFRs share tertiary structure conservation among all species[5, 10]. In contrast, R67 DHFR catalyzes the same reduction reaction of DHF using NADPH but is structurally and evolutionarily distinct from chromosomal DHFRs, sharing no homology with respect to primary amino acid sequence or tertiary structure[2]. While structural differences form the basis for the resistance of the microbial R67 DHFR to the antibiotic TMP, they also highlight the potential in the creation of inhibitors that are selective to R67 DHFR.

To broaden our screening effort for discovery of more potent, selective inhibitors of R67 DHFR, we investigate screening conditions that best satisfy the requirements of maintaining the activity of two structurally unrelated enzymes (the target, R67 DHFR and the control, hDHFR) while providing adequate compound dissolution. While organic cosolvents increase the aqueous solubility of non-polar molecules, they often lead to enzyme inactivation, as we observed upon exposing the DHFRs to DMSO[1, 11]. As potential alternatives to DMSO for screening these DHFRs, we examine the use of dimethylformamide (DMF): it has a high capacity for dissolution of organic compounds, and has been used as a ‘water mimicking solvent’ through H-bond networks with some enzymes[12-13]. Acetonitrile (ACN) and methanol (MeOH), routinely used as analytical cosolvents and for preparation and storage of compound stock solutions, were also assessed[14]. We also examine the use of ionic liquids (ILs), as they have been proposed

as alternative cosolvents in various biocatalytic transformations[15-18]. In general, enzymes dissolved in pure ILs show reduced catalytic activity, but the addition of ILs to water can help improve enzyme stability and activity[19-21], making ILs viable alternatives for use in compound screening. However, their effect on specific enzyme systems must be determined empirically.

To this end, we determined the effect on R67 DHFR and hDHFR enzyme activity of those organic cosolvents as well as 1-butyl-3-methylimidazolium ILs ([BMIm]) bearing different anions, previously shown to be compatible with function of certain oxidoreductases[15-16, 19, 22-23]. We further considered the maintenance of thermodynamic, kinetic and thermostability properties by determining IC_{50} for known inhibitors as well as k_{cat} , K_M and T_m under various cosolvent conditions, to verify whether the cosolvents affected fold or function. Finally, we considered the effectiveness of the cosolvents in aiding dissolution of high concentrations of small organic compounds such as those typically used in inhibitor design and screening.

2.2.3. MATERIALS AND METHODS

Materials

Acetonitrile (ACN) was purchased from EMD Chemicals (Gibbstown, NJ), dimethylformamide (DMF) from A&C American Chemicals LTD (Montreal, QC), isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside (IPTG) from Bioshop (Burlington, ON), dimethylsulfoxide (DMSO) and methanol (MeOH) from Fisher Scientific (Ottawa, ON). The ionic liquid BMIm octylsulfate was purchased from Alfa Aesar (Haverhill, MA) while the ionic liquids BMIm hexafluorophosphate ([BMIm][PF₆]) and BMIm tetrafluoroborate ([BMIm][BF₄]) were synthesized as described previously[23-24] (¹H NMR data for [BMIm][PF₆] and [BMIm][BF₄] are provided as Supporting Information). Methotrexate (MTX) was bought from Sigma Aldrich. Pemetrexed (PMTX) (ALIMTA) from Eli Lilly (Toronto, ON) was supplied as a 1:1 mixture with D-mannitol as a stabilizer. Molecules **1** (2,2'-[1,5-pentanediy]bis(4-oxyphenylene)-bis-1H-benzimidazole-5-carboxylic acid) and **2** (2'-(4,4'-(2-hydroxypropane-1,3-diyl)-bis-(4-oxyphenylene)-bis-1H-benzimidazole-5-carboxylic acid) were synthesized as described previously[1].

Enzyme purification

Recombinant human chromosomal DHFR (hDHFR) was overexpressed in *Escherichia coli* BL21 (DE3) and purified as described in [25]. Recombinant Type II R67 DHFR was overexpressed in *E. coli* BL21 containing the plasmid pREP4 (Qiagen, Mississauga, ON) as described in [26] with the following modifications. For a 1 L expression culture, the cell pellet was resuspended in 30 mL of lysis buffer (0.1 M potassium phosphate, 5 mM imidazole, pH 8.0), and the cells were disrupted by one passage through a cell disrupter (Constant Systems, Kennesaw, GA) adjusted to 27 kpsi. An additional 10 mL of buffer washed residual lysate through. Following centrifugation (30 min, 23500 g, 4°C) and filtration through a 0.22 μ m filter, the supernatant was injected onto a 5 mL His-Trap HP cartridge at a flow-rate of 1 mL/min using an Äkta FPLC (GE Healthcare, Piscataway, NJ). The column was washed with 12 column volumes (CV) of lysis buffer. A linear gradient (6 CV) to a plateau (6 CV) at 30 mM imidazole was followed by a step to 300 mM imidazole for elution. Fractions containing R67 DHFR were identified according to activity assay and analysis on tricine SDS-PAGE[27], and pooled for

dialysis at 4°C into to 0.1 M phosphate buffer, pH 8.0 using 3500 Da molecular weight cut-off dialysis tubing (Spectrum Laboratories Inc., Rancho Dominguez, CA). Protein concentration was determined using the Bio-Rad protein assay (Bio-Rad, Hercules, CA) with bovine serum albumin (BSA; Bio-Rad) as a protein standard.

Determination of enzyme activity in the presence of cosolvents

Substrate concentrations were quantified spectrophotometrically in 50 mM potassium phosphate, pH 8.0 ($\epsilon_{340\text{nm}} = 6,200 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ for NADPH and $\epsilon_{282\text{nm}} = 28,400 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ for DHF). Reactions were initiated by the addition of 0.6 mU of either R67 DHFR or hDHFR in presence of 100 μM each of DHF and NADPH, where 1 U represents the quantity of enzyme required to consume 1 μmol of substrate per minute. The reactions were in 50 mM potassium phosphate buffer at pH 7.0 for R67 DHFR and pH 8.0 for hDHFR, in 384- or 96-well polystyrene plates. Enzyme activity was determined by monitoring the initial rate (within the first 10% of substrate consumption) of depletion of NADPH and DHF at 340 nm ($\Delta\epsilon_{340\text{nm}} = 12,300 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$)[28]. Liquid handling was mainly carried out using a BioMek NX automated workstation (Beckman Coulter, Brea, CA) and data collected with the integrated Beckman DTX 880 plate-reader.

Determination of K_M and k_{cat} of R67 DHFR and hDHFR in the presence of cosolvents

Kinetic assays were performed with 10% DMSO, 10% DMF, 10% MeOH, 15% ACN, 10% [BMIm][BF₄] or 10% [BMIm][OctSO₄]. All kinetic assays were performed using 1 cm cuvettes at 300K in 50 mM potassium phosphate except for [BMIm][BF₄] which tended to form a precipitate due to a salting-out effect frequently observed upon mixing ILs with ionic buffers such as the phosphate buffer used here[29]. Thus, kinetic assays in 1 cm cuvette using [BMIm][BF₄] were performed in MATS buffer pH 7.0 (25 mM MES, 25 mM acetate, 50 mM Tris, 100 mM sodium acetate).

For the determination of K_M^{NADPH} and K_M^{DHF} , the concentration range of the variable substrate bracketed the reported K_M values (NADPH: 1 μM to 50 μM ; DHF: 1.56 μM to 100 μM) except when saturation was attained at concentrations too low for accurate activity determination[26]. The second substrate was kept at a saturating concentration of 50 μM . Initial rates were measured, where < 20% substrate conversion to product had occurred. The reaction

was initiated by adding 0.1-4 mU of R67 DHFR or 0.1-0.6 mU of hDHFR to the reaction mix. The measurements were carried out using a Cary 100 Bio spectrophotometer (Varian Canada Inc., ON). Data were fit to the Michaelis-Menten equation using non-linear regression analysis with GraphPad Prism version 6.04 for Windows (GraphPad Software, San Diego, CA).

Concentration effect in the two-phase aqueous/[BMIm][PF₆] system

To mimic the reduced volume of the aqueous phase upon increasing the concentration of the water-immiscible [BMIm][PF₆] (to 10%, 20%, 40%, 60% and 80% of [BMIm][PF₆]), the concentration of DHF, NADPH and enzyme were increased by a factor of 1.14, 1.15, 1.7, 2.5 and 5, respectively. For example, to mimic 60% of [BMIm][PF₆], the concentration of DHF and NADPH were increased from 100 μ M to 250 μ M and the concentration of enzyme increased to from 200 nM to 500 nM (R67 DHFR) or from 30 nM to 75 nM (hDHFR). Assays were carried out in 384- or 96-well plates as described above. When the absorbance surpassed the linear detection range of the plate-reader (1.5 absorbance units), the volume of the assay was decreased, to diminish the path length.

Inhibition of hDHFR and R67 DHFR

MTX was dissolved in 0.05M KOH and quantified by spectrophotometry in 0.1 M NaOH using $\epsilon_{258\text{nm}} = 22,100 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ [30]. PMTX was dissolved and quantified in 0.9% NaCl (154 mM) ($\epsilon_{226\text{nm}} = 31,200 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$)[30]. Dilutions were made in the appropriate pure cosolvent except for R67 DHFR inhibition where dilutions of PMTX were made in 0.9% NaCl (154 mM) for assays with organic solvent or in 50 mM potassium phosphate pH 7.0 for assays with IL. Molecules **1** and **2** were dissolved in neat DMF or DMSO and diluted to the appropriate concentration. The reaction mix for hDHFR contained 100 μ M each of DHF and NADPH in 50 mM potassium phosphate buffer, pH 8, as well as cosolvent and inhibitor. For R67 DHFR, the reaction mix contained 50 μ M each of DHF and NADPH in 50 mM potassium phosphate buffer, pH 7, as well as cosolvent and inhibitor, except for PMTX which was solubilized in 0.9% NaCl (154 mM) and added prior to cosolvents. The reaction was initiated by adding 0.6 mU of enzyme to the reaction mix. Enzyme activity was determined as described above. The IC₅₀ values were determined with GraphPad Prism using the log [inhibitor] vs response equation.

Thermal scanning fluorimetry shift assays

Differential scanning fluorimetry (DSF) can be used to determine the thermal stability of a protein or a protein-ligand complex. It exploits the difference in quenching of a fluorescent dye when in a polar environment such as aqueous solution relative to a hydrophobic region such as the exposed hydrophobic core of a denatured protein[31]. DSF assays were performed as previously described[32]. For hDHFR, 2 or 4 μM enzyme was assayed with $2.5 \times$ and $3.33 \times$ SYPRO-Orange (5000 \times solution in DMSO from Invitrogen). For R67 DHFR, 5 or 10 μM enzyme was assayed with $2.5 \times$, $3.33 \times$ and $5 \times$ SYPRO-Orange. Assays were conducted in 50 mM potassium phosphate, pH 8, with 1% DMSO as the carrier of SYPRO-Orange, in a final volume of 20 μL per well. Control reactions were performed in the absence of enzyme or cosolvent. The 96-well plates were sealed with Optically Clear Sealing Tape (Sarstedt). The plate was heated from 20°C to 95°C in a LightCycler 480 apparatus (Roche) with a ramp speed of 0.02°C s⁻¹. Twenty acquisitions/°C were obtained with 1 s exposure time. A CCD camera measured the fluorescence using $\lambda_{\text{exc}} = 483 \text{ nm}$ and $\lambda_{\text{em}} = 568 \text{ nm}$.

2.2.4. RESULTS AND DISCUSSION

Cosolvents affect the activity of R67 DHFR and hDHFR in distinct ways

In order to perform fragment screening, cosolvents are required to solubilize the test compounds. At early stage screens for hits, assays should be performed in the millimolar range to increase the likelihood of observing even weak inhibition as in the case of fragment-based design, thus requiring effective solubilisation without denaturing the target enzyme. While screening for inhibitors of R67 DHFR, inhibitor selectivity was verified by assaying hDHFR in parallel. Their structural differences are such that the effect of a cosolvent on one DHFR may not be predictive of its effect on the other DHFR. To this effect, we investigated the impact of the commonly used organic cosolvents MeOH, ACN, DMF and DMSO on the activity of both DHFRs in concentrations ranging up to 25%. We note that the high volatility of MeOH required that it be handled with special consideration (Table 2-1).

In the case of R67 DHFR, increasing concentrations of each of the tested cosolvents resulted in a gradual decrease of the initial reaction rate (Figure 2-2A). While DMSO was the least disruptive toward activity of R67 DHFR at 5% cosolvent (85% activity remaining, compared to \approx 50-60% for all others), 10% DMSO resulted in a drop in activity to 30%, as did 10% DMF. Higher concentrations of DMSO and DMF dropped activity to below 10% and were not further considered. MeOH or ACN both retained nearly 60% of the enzyme activity at 10% cosolvent, and 30% activity at 15% cosolvent.

In the case of hDHFR (Figure 2-2B), a similar effect of DMSO was observed, where 5% DMSO had no effect on activity while 10% DMSO reduced activity to 60%. MeOH was the most disruptive to activity when used at 5% (\approx 60% activity remaining), though its effect at higher concentrations was similar to that of DMF and DMSO (\approx 50-60% activity remaining at 10% cosolvent and \approx 45-55% activity remaining at 15% cosolvent). Strikingly, the addition of 5-20% ACN scarcely reduced hDHFR activity (\approx 90% activity remaining).

Table 2-1 Protocol table for cosolvent analysis and final choice for early and late stage screening

Step	Parameter	Value	Description
1	Buffer	60 μ L	Enzyme specific
2	Substrates	20 μ L	500 μ M of NADPH and 500 μ M of DHF
3	Compound stock solution	10 μ L	Compound in 100% co-solvent
4	Enzyme	10 μ L	0.6 mU of R67 DHFR or of hDHFR
5	Positive control	10 μ L	100% co-solvent without compound
6	Negative control	10 μ L	Buffer instead of enzyme solution
7	Assay readout	340 nm, 5 min	Absorbance, plate reader
Step	Notes		
1	Appropriate buffer for each enzyme assayed.		
2	Freshly prepared stock solution: 5-fold the assay concentration (100 μ M of each, final).		
3	Choose co-solvent that minimally affects enzyme activity: DMSO, DMF to dissolve high concentrations for early screening, MeOH for late screening using lower compound concentrations; ensure no visible precipitation. Note that compounds should be dissolved immediately prior to use unless it is known that compounds remain stable upon storage in each given co-solvent.		
4	Careful mixing.		
5	Same co-solvent as in step 3. Careful observation should be made to insure that automated pipetting of MeOH volumes are reproducibly aspirated and are dispensed rapidly to prevent loss (dripping) due to low surface tension. If loss is observed, it can be circumvented by conditioning (pre-wetting) tips, by aspirating, dispensing, and aspirating the desired volume again to prevent leaking. Finally, enzyme assays were conducted at a smaller scale (for example, one single row or column of a multi-well plate) in the presence of MeOH to prevent significant evaporative loss.		
6	Same buffer as the enzyme solution.		
7	Analysis of the initial rate: $\leq 10\%$ substrate consumption; visual inspection of assay wells to confirm no precipitation has occurred.		

Because all organic solvents tested significantly reduced DHFR activity, ILs were tested as alternative cosolvents. The most widely studied ILs in biocatalysis using oxidoreductases such as dehydrogenases, peroxidases, are the imidazolium-based ILs, bearing different counterions including PF_6^- , BF_4^- , OctylSO_4^- , MeSO_4^- and NTf_2^- [16, 18, 33-37]. While we previously demonstrated that hDHFR is active when surface-immobilized using an imidazolium bromide IL self-assembled monolayer [38], to our knowledge no study has yet reported on the effect of ILs on any DHFR in solution. Here, we tested two water-miscible ILs, $[\text{BMIm}][\text{OctSO}_4]$ and $[\text{BMIm}][\text{BF}_4]$, and water-immiscible IL, $[\text{BMIm}][\text{PF}_6]$, as cosolvents for R67 DHFR and hDHFR.

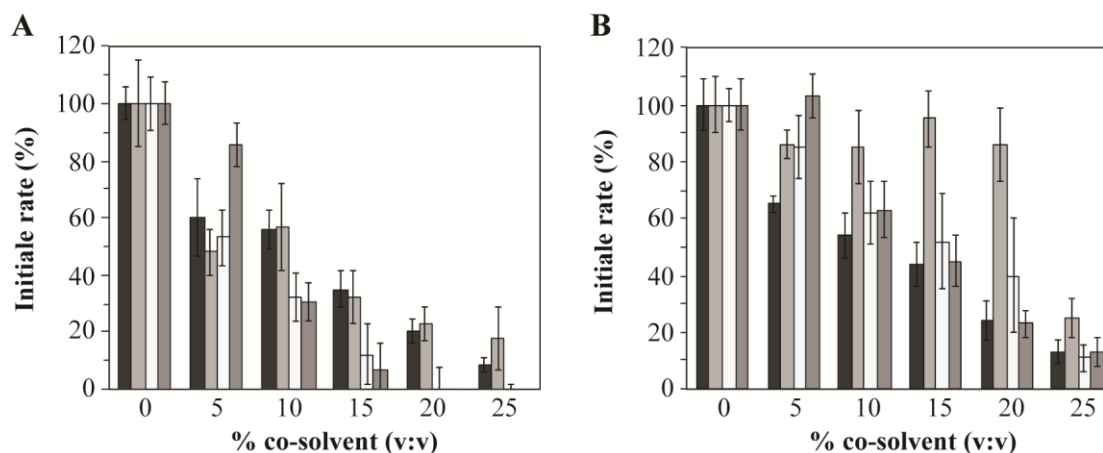


Figure 2-2 Initial rate of the enzymatic reaction for (A) R67 DHFR and (B) hDHFR in the presence of increasing concentrations of organic cosolvents

(■) MeOH, (■) ACN, (□) DMF, (■) DMSO. Enzyme activity in the absence of cosolvent was the reference value. Values are given as the mean \pm standard deviation for the results of at least two independent experiments performed in triplicate.

Activity of R67 DHFR decreased gradually with increasing concentrations of [BMIm][OctSO₄] (Figure 2-3A). At 10% and 40% of [BMIm][OctSO₄], \approx 75% and 50% of R67 DHFR activity remained, respectively. In contrast, hDHFR lost all activity even at the lowest concentration of [BMIm][OctSO₄] tested (5%). Changing the counter-anion to procure [BMIm][BF₄] produced very different results: hDHFR was fully active up to 10% [BMIm][BF₄], while only 5% [BMIm][BF₄] reduced R67 DHFR activity to 65% (Figure 2-3B). Tests at higher concentrations of [BMIm][BF₄] were limited by increased solution acidity[20] which is crucial for maintenance of the quaternary structure of R67 DHFR[39] and to maintain chemical integrity of the substrates. Accordingly, increasing the concentration of [BMIm][BF₄] to 10% and 15% decreased the activity of R67 DHFR drastically to 17% and to 5%, respectively. Approximately 85% inactivation of hDHFR was observed at 20% [BMIm][BF₄].

We also investigated the water-immiscible IL [BMIm][PF₆]. Water-immiscible cosolvents provide an organic phase with the potential for better dissolution of hydrophobic compounds. Partition of the components *via* the interface of the biphasic system has been investigated in a number of systems[40-41]. However, water-immiscible organic solvents may result in enzyme denaturation at the aqueous interface; less is known about the effect of biphasic ILs on enzymes, particularly with respect to water-soluble enzymes.

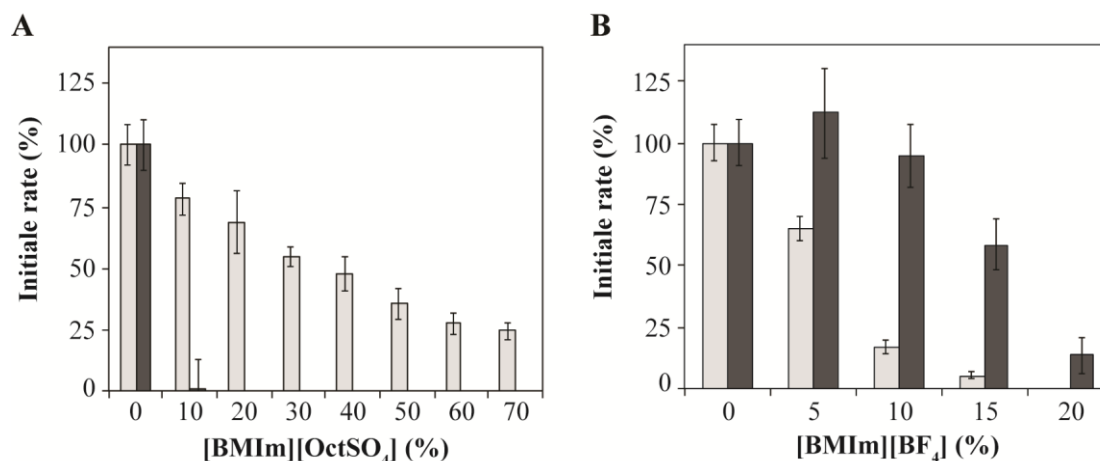


Figure 2-3 Initial rate of the enzymatic reaction for R67 DHFR (□) and hDHFR (■) with a water miscible IL as cosolvents

(A) [BMIm][OctSO₄] and (B) [BMIm][BF₄]. No activity was observed for hDHFR in the presence of even 5% [BMIm][OctSO₄] (not shown). Enzyme activity in the absence of IL was the reference value. Values are given as the mean \pm standard deviation for the results of three independent experiments performed in triplicate.

Enzyme activity of both DHFRs increased with increasing concentrations of [BMIm][PF₆] (Figure 2-4). Indeed, at 70 - 80% [BMIm][PF₆], the relative activity of both enzymes was $\geq 200\%$ of the initial activity. For these enzyme assays, the initial quantity of the substrate DHF, the cofactor NADPH and the DHFR enzyme were held constant, while the variables were the volumes of IL and aqueous buffer (with final volume held constant). Our results suggest that the water-soluble DHFRs and reagents become more concentrated as the volume of the aqueous phase shrinks, with poor partitioning into the increasing volume of non-miscible IL. To take this into account, the concentrations of substrate, co-factor and enzyme were recalculated as a function of only the volume of aqueous phase. For example, at 80% volume of IL, the aqueous phase (20% volume) will contain a 5 times greater concentration of enzyme and reagents. Upon applying the calculated concentrations to simple enzyme assays (in the absence of IL), enzyme activity increased with increasing concentration of enzyme and reagents, as expected (Figure 2-4, dashed lines). However, the increase was greater than that observed in the presence of [BMIm][PF₆], reaching 600-700% of the control (standard reagent concentrations) under conditions mimicking 80% [BMIm][PF₆]. The increased activity observed at high concentrations of [BMIm][PF₆] is thus less than expected if the enzyme and reactants remained entirely in the aqueous phase. Analysis of the protein concentration remaining in the aqueous phase after incubation with 80% [BMIm][PF₆] indicates that only approximately 30% of R67 DHFR remained (Figure S 2-1). This is consistent with at least part

of the reduction in enzyme activity (from the expected 600-700% to the observed 200%) being due to decreased enzyme concentration in the aqueous phase.

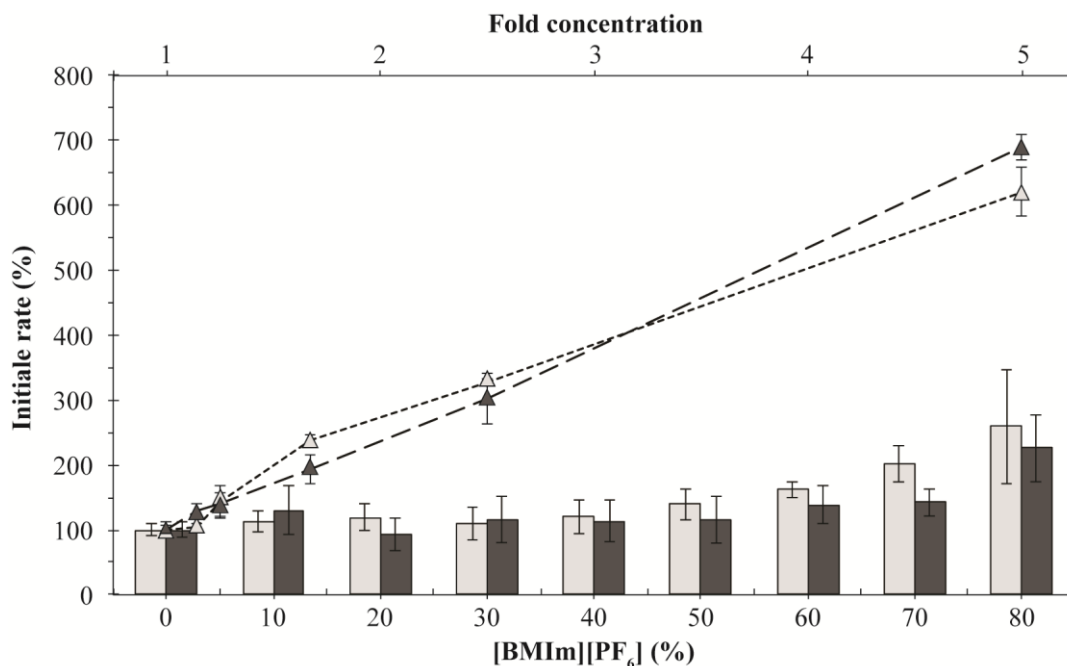


Figure 2-4 Initial rate of the enzymatic reaction for R67 DHFR and hDHFR with the water-immiscible IL [BMIm][PF₆], and expected increase in enzyme activity if reactants and enzyme partition fully into the aqueous phase.

The bar chart plots the R67 DHFR (□) and hDHFR (■) activities with increasing concentrations of [BMIm][PF₆]. Enzyme activity in absence of cosolvent was the reference value. The scatterplot displays the effect of increasing concentrations of reaction components (DHF, NADPH and DHFR) on activity of R67 DHFR (△) and hDHFR (▲), as described under Results. The fold-concentrations of 1.0, 1.1, 1.3, 1.7, 2.5 and 5.0 mimic the residual aqueous volume at 0, 10, 20, 40, 60 and 80% [BMIm][PF₆], respectively, assuming full partitioning of the enzyme and reactants in the aqueous phase. Values are given as the mean ± standard deviation for the results of three independent experiments performed in triplicate.

Overall, the cosolvent systems offering the highest conservation of enzyme activity for R67 DHFR were 10-15% of [BMIm][OctSO₄], MeOH or ACN, and for hDHFR were [BMIm][BF₄], MeOH, ACN, DMSO or DMF. The differences in cosolvent preference of both DHFRs underscore the empirical nature of choice of cosolvent for a given enzyme. The concentrations of organic cosolvents chosen for further experiments were: 15% ACN, 10% DMF, 10% MeOH and 10% DMSO as well as 10% [BMIm][OctSO₄] for R67 DHFR and 10% [BMIm][BF₄] for hDHFR. It is noteworthy that activity of both DHFRs was not significantly affected by 10-20% [BMIm][PF₆]. While it could be considered a potential cosolvent system compatible with activity of both DHFRs, the unknown partitioning of reagents and, crucially,

of the various compounds being screened, led us to discount the biphasic IL [BMIm][PF₆] as a potential screening cosolvent.

Effect of cosolvents on inhibition of R67 DHFR and of hDHFR

To verify whether the cosolvent systems promote native-like inhibitor binding, we investigated the reproducibility of R67 DHFR inhibition with inhibitors **1**, **2** and PMTX, and hDHFR inhibition with MTX and PMTX (Figure 2-1), in the presence of various cosolvents by comparing IC₅₀ and ligand efficiency (LE). LE expresses the ratio of the affinity of a ligand divided by the number of non-hydrogen atoms, and is adopted here to compare our results in the terms that are most often used in fragment-based design[42].

Molecules **1**, **2** and PMTX are weak inhibitors of R67 DHFR, with IC₅₀ in the mid-to-high μ M range, thus requiring stock inhibitor solutions as high as the mM range[1]. Molecules **1** and **2** were soluble only in DMSO and in DMF. IC₅₀ for **1** were similar (3-fold difference) when DMSO and DMF served as cosolvent, as confirmed by their similar LE values (Table 2-2). While decrease in R67 DHFR activity ($87 \pm 8\%$) was observed with 300 μ M of **2** solubilized in DMF, the absorbance signal saturated above 300 μ M of **2**, precluding the precise determination of IC₅₀ in DMF and thus preventing comparison to DMSO. PMTX was poorly soluble in all cosolvents at the high concentrations required. To resolve this issue, it was solubilized in 0.9% NaCl, and the cosolvents were added afterward. Little variation of IC₅₀^{PMTX} or LE values were observed (within 2 to 5-fold and within 0.03 difference, respectively).

The same trend for PMTX inhibition was observed for hDHFR, with 3 to 4-fold increases in IC₅₀^{PMTX} and with 0.02 to 0.03 difference in LE, except in the presence of ACN (> 20-fold increase and 0.06 difference, respectively) and [BMIm][BF₄] (nearly 30-fold increase and 0.07 difference, respectively). MTX inhibition of hDHFR showed yet greater maintenance of IC₅₀^{MTX}, remaining within 2-fold except a 3-fold increase with ACN (LE values varying by 0.01 to 0.02).

Table 2-2 IC₅₀ of MTX and PMTX against hDHFR and IC₅₀ of 1, 2 and PMTX against R67 DHFR in organic cosolvents and IL^a.

Enzyme	Co-solvent	IC ₅₀ ¹ ^b <i>LE</i>	IC ₅₀ ² <i>LE</i>	IC ₅₀ ^{PMTX} <i>LE</i>	IC ₅₀ ^{MTX} <i>LE</i>
R67 DHFR	None	NS ^c	NS	300 ± 66 -0.22	-
	10% DMSO	64 ± 11 ^d -0.18	130 ± 11 ^d -0.18	780 ± 170 -0.20	-
	10% DMF	180 ± 22 -0.17	>300 > -0.16	880 ± 66 -0.20	-
	10% MeOH	NS ^c	NS	440 ± 63 -0.21	-
	15% ACN	NS	NS	1 650 ± 340 -0.19	-
	10% [BMIm][BF ₄]	ND ^e	ND	ND	-
	10% [BMIm][OctSO ₄]	NS	NS	470 ± 39 -0.21	-
hDHFR	None	-	-	0.75 ± 0.3 ^f -0.34	41 ± 14 ^f -0.24
	10% DMSO	-	-	2.4 ± 0.7 -0.31	57 ± 14 -0.24
	10% DMF	-	-	3.0 ± 1.4 -0.31	26 ± 3 -0.25
	10% MeOH	-	-	2.2 ± 1.3 -0.32	25 ± 3 -0.25
	15% ACN	-	-	16 ± 10 -0.28	130 ± 57 -0.22
	10% [BMIm][BF ₄]	-	-	21 ± 15 -0.27	41 ± 9 -0.24
	10% [BMIm][OctSO ₄]	-	-	ND	ND

^a Values are given as the mean ± standard deviation for the results of two independent experiments performed in triplicate.

^b Values taken from Table 2.2 in [1].

^c NS: Not soluble.

^d Values taken from Table 2.2 in [28].

^e ND: Not determined; enzyme is inactive in that cosolvent.

^f - : is not an inhibitor of that DHFR.

While ACN effectively maintained high activity of both DHFRs (Figure 2-2), it was the most disruptive with respect to IC_{50} values and may thus bias inhibitor-screening results. Similarly, [BMIm][BF₄] procured high activity of hDHFR but poor conservation of IC_{50}^{PMTX} for both DHFRs. Notably, [BMIm][BF₄] did not alter MTX inhibition. Globally, our results indicate that the cosolvents investigated generally maintained inhibitor binding and may thus be considered for inhibitor screening.

Efficiency of cosolvents in solubilizing compounds for inhibitor discovery

For fragment screening purposes, stock solutions of compounds can be made in pure solvent then diluted in aqueous buffer to 10% cosolvent[43]. We thus verified the capacity of the pure solvents to solubilize mM concentrations of a set of small organic molecules that we had previously screened against both DHFRs (Table S 2-1)[1]. Those molecules are often nitrogen-containing heterocycles, chosen in loose analogy to folates and thus represent a moderate chemical diversity. DMSO and DMF performed equally well and were more efficient at solubilizing the compounds of interest than were MeOH and ACN. However, as shown above, both 10% DMSO and 10% DMF resulted in a loss of ≥ 70 % of activity for R67 DHFR and as such do not represent ideal screening conditions.

The two water-miscible ILs, [BMIm][OctSO₄] and [BMIm][BF₄], were only moderately effective in solubilizing mM concentrations of the small hydrophobic test compounds (Table S 2-1). [BMIm][OctSO₄] dissolved slightly more than half of the compounds while [BMIm][BF₄] dissolved less than half of the compounds. The high viscosity of pure [BMIm][OctSO₄] made it a difficult medium in which to work. Thus, despite procuring good retention of enzyme activity, the narrow capacity of these ILs for dissolution of small organic compounds indicates that they are not ideal cosolvents for screening hydrophobic compounds in high concentrations, such as required for early-stage screening.

We have thus shown that 10% of MeOH, DMSO, DMF, [BMIm][BF₄], [BMIm][OctSO₄] and 15% ACN could maintain sufficient activity of both DHFRs to conduct fragment screening assays with confidence. DMSO and DMF were shown to be most efficient in solubilizing hydrophobic compound-based libraries in the high mM range, and could thus be choice cosolvents for early-stage screening, whereas MeOH, [BMIm][BF₄] and

[BMIm][OctSO₄] could be suited to screening more hydrophilic compound-based libraries and/or lower concentrations of compounds when screening more advanced compound generations. In all these studies, compounds were dissolved immediately prior to use. The cosolvents resulted in modest increases in IC₅₀ for the inhibitors tested, generally within 3-fold. A protocol table reporting guidelines for setting up fragment screening is presented in Table 2-1. To clarify the effects of the cosolvents on both DHFRs, we investigated their effects on enzyme kinetics and thermostability in more detail.

Effect of cosolvents on catalytic parameters and protein thermostability

The decreased enzyme activity and altered inhibition may result, among other causes, from direct enzyme inhibition by the cosolvent or from partial enzyme denaturation. To distinguish between these possibilities, we investigated the kinetic parameters k_{cat} (turnover number) and K_M (productive affinity) using the natural substrates (Table 2-3) and determined the T_m values (melting temperatures) through DSF analysis to verify whether the cosolvents induce enzyme denaturation or destabilisation (Table 2-4). Thus, through kinetic and thermostability studies, we sought to understand if the cosolvents act not only as solvent molecules but also as ligands or inhibitors.

The cosolvents generally resulted in a reduction of k_{cat}/K_M^{NADPH} and k_{cat}/K_M^{DHF} . This was mainly due to variation of K_M (up to 35-fold) rather than k_{cat} (no more than 5-fold). This implies that cosolvents disrupt productive binding of the substrates to a greater extent than the rate of product formation. In the case of R67 DHFR, the reference kinetic values determined in the absence of cosolvent were consistent with those previously reported (Table 2-3)[26]. Marginal decreases were observed for k_{cat}/K_M^{NADPH} (2 to 4-fold) in organic cosolvents, whereas significant reductions were observed for k_{cat}/K_M^{DHF} (6 to 170-fold). According to those results, the catalytic efficiency of R67 DHFR was the highest in MeOH, followed by DMSO, DMF and [BMIm][OctSO₄] whereas it was lowest in ACN.

We investigated whether the disruption of substrate binding resulted from structural alteration of the enzyme by determining its thermal stability. No significant difference in T_m was observed in 10% DMSO ($\Delta T_m = 1.1^\circ\text{C}$), and a slightly lower thermostability ($\Delta T_m = 2.2 -$

3.0°C) was observed in DMF, MeOH and ACN reflecting slight structural destabilization (Table 2-4). We note that thermal denaturation was performed in only 5% DMF rather than 10% DMF; the latter conditions were inconclusive as multiple minima were observed. Thus, the secondary structure of R67 DHFR is at most slightly destabilized by those cosolvents.

The thermal denaturation curves in as low as 5% [BMIm][OctSO₄] were uninterpretable because the fluorescence signal decreased as the temperature increased, where the fluorescence signal should increase as the protein unfolds. This could be caused by the propensity of ≥ 1 % [BMIm][OctSO₄] to form micelles[44]. We note that the T_m values reported here by DSF with SYPRO-Orange in 50 mM potassium phosphate, pH 8.0 differ from values reported using differential scanning calorimetry in different conditions (50 mM acetic acid + 50 mM MES + 100 mM Tris + 10mM β -mercaptoethanol pH 5.0 and 5 mM dithiothreitol)[45]. That acidic pH was used to monitor the pH-dependent dissociation of the R67 DHFR intimate dimers into monomers rather than reporting on the denaturation of the tetrameric species as investigated here.

A further potential contributor to the altered kinetic parameters is different accessibility of solvent molecules into the active site that could interfere with catalysis. Interestingly, the observed variations of K_M^{NADPH} and K_M^{DHF} for R67 DHFR are consistent with earlier studies regarding the perturbation of solvent composition on the catalysis of this enzyme where NADPH and DHF bind the same interface in the symmetric active site of R67 DHFR[4, 46]. In that work, Chopra *et al.*[4] showed that R67 DHFR binds NADPH using a dry interface, in contrast to DHF that interacts with R67 DHFR less directly using a wet interface, through water contacts. The binding of NADPH to R67 DHFR generates the net release of 38 water molecules, whereas the binding of DHF to R67 DHFR is accompanied by the net uptake of water[4]. R67 DHFR's active site forms an hour-glass-shaped tunnel that bisects the tetramer and fits one molecule of NADPH and one of DHF. The tunnel is 24 Å long, 11 Å wide at the central narrows and 18 Å wide near each end of the tunnel[47]. Thus, a large population of solvent molecules occupies the voluminous R67 DHFR active-site cavity.

If water is involved in a binding interaction, perturbation of water content should alter its affinity for the enzyme[46]. The large and mostly hydrophobic active site of R67 DHFR could be accessible to cosolvent molecules, perturbing the water content. The cosolvent

Table 2-3 Kinetic constants for the reaction of DHF and NADPH by R67 DHFR and hDHFR^a

Enzyme	Substrate	Cosolvent	K_M (μM)	k_{cat} (s^{-1})	k_{cat}/K_M ($\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$)
R67 DHFR	NADPH	None	3.7 ± 0.9	0.29 ± 0.04	$8 \pm 1 \times 10^4$
		10%DMSO	8.0 ± 4.0	0.12 ± 0.02	$1.8 \pm 0.7 \times 10^4$
		10%DMF	2.2 ± 0.2	0.09 ± 0.01	$4.0 \pm 0.3 \times 10^4$
		10%MeOH	7.0 ± 1.0	0.30 ± 0.03	$4.3 \pm 0.3 \times 10^4$
		15%ACN	3.7 ± 0.7	0.11 ± 0.01	$3.0 \pm 1.0 \times 10^4$
		10%[BMIm][OctSO ₄]	23 ± 11	0.32 ± 0.04	$1.5 \pm 0.5 \times 10^4$
		10%[BMIm][BF ₄]	ND ^b	ND ^b	ND ^b
	DHF	None	1.9 ± 0.3	0.33 ± 0.02	$17 \pm 3.0 \times 10^4$
		10%DMSO	22 ± 1.0	0.17 ± 0.001	$0.75 \pm 0.03 \times 10^4$
		10%DMF	45 ± 3.0	0.18 ± 0.004	$0.40 \pm 0.03 \times 10^4$
		10%MeOH	9.0 ± 1.0	0.28 ± 0.01	$3.0 \pm 0.4 \times 10^4$
		15%ACN	68 ± 12	0.067 ± 0.007	$0.10 \pm 0.01 \times 10^4$
		10%[BMIm][OctSO ₄]	40 ± 5.0	0.40 ± 0.01	$1.0 \pm 0.09 \times 10^4$
		10%[BMIm][BF ₄]	ND ^b	ND ^b	ND ^b
hDHFR ^c	NADPH	None	< 1	2.2 ± 0.1	$> 2.2 \pm 0.1 \times 10^6$
		10%DMSO	2.2 ± 0.8	1.5 ± 0.06	$0.7 \pm 0.2 \times 10^6$
		10%DMF	2.1 ± 0.3	2.3 ± 0.1	$1.1 \pm 0.1 \times 10^6$
		10%MeOH	1.6 ± 0.2	2.3 ± 0.09	$1.5 \pm 0.2 \times 10^6$
		15%ACN	5.6 ± 0.4	2.3 ± 0.04	$0.40 \pm 0.04 \times 10^6$
		10%[BMIm][OctSO ₄]	ND ^b	ND ^b	ND ^b
		10%[BMIm][BF ₄]	29 ± 13	3.0 ± 2.0	$0.12 \pm 0.02 \times 10^6$
	DHF	None	< 1.6	3.9 ± 0.2	$> 2.5 \pm 0.2 \times 10^6$
		10%DMSO	< 1.6	1.5 ± 0.2	$> 1.0 \pm 0.1 \times 10^6$
		10%DMF	< 1.6	2.0 ± 0.2	$> 1.3 \pm 0.1 \times 10^6$
		10%MeOH	< 1.6	1.6 ± 0.2	$> 1.0 \pm 0.1 \times 10^6$
		15%ACN	< 1.6	0.85 ± 0.06	$> 0.55 \pm 0.04 \times 10^6$
		10%[BMIm][OctSO ₄]	ND ^b	ND ^b	ND ^b
		10%[BMIm][BF ₄]	$> 100^d$	ND ^e	ND ^e

^a Values are given as the average +/- standard deviation from the mean of experiments performed in triplicate.

^b ND: Not determined; enzyme activity was too low.

^c K_M and k_{cat}/K_M estimated; the lowest substrate concentration used was saturating.

^d K_M not determined; substrate saturation was not achieved at 100 μM .

^e ND: Not determined; V_{max} was not reached.

molecules could enter completely or partially in R67 DHFR's active site as their lengths vary from 1.5 – 12.1 Å (water < MeOH \approx ACN < BF₄⁻ < DMF < DMSO < BMIm⁺ < OctSO₄⁻). Replacement of water molecules by cosolvent could reduce the water contacts required for DHF binding but would have little effect on the dry interface of NADPH binding[4]. Indeed, the greater observed variations in K_M^{DHF} (5 to 36-fold) than for K_M^{NADPH} (1 to 6-fold) in the

presence of cosolvents is coherent with the alteration of the water content by the addition of those cosolvents, consistent with the study of Chopra *et al*[4].

Table 2-4 T_m (°C) values of R67 DHFR and of hDHFR from thermal scanning fluorimetry shift assays.

Enzyme	Conditions	T_m (°C)		
R67 DHFR	No solvent	53.7	±	1.1
	10% DMSO	52.6	±	1.5
	5% DMF ^a	51.4	±	0.8
	10% MeOH	51.1	±	0.8
	15% ACN	50.7	±	1.4
	5% [BMIm][BF ₄]	ND ^b		
	5% [BMIm][OctSO ₄]	ND ^c		
hDHFR	No solvent	40.1	±	0.3
	10% DMSO	37.6	±	0.2
	5% DMF ^d	36.7	±	0.6
	10% MeOH	38.6	±	0.3
	15% ACN	39.0	±	0.5
	5% [BMIm][BF ₄] ^d	35.7	±	0.3
	10% [BMIm][OctSO ₄]	ND ^b		

^a DMF was used a 5% because thermal denaturation curves performed in 10% DMF were not interpretable.

^b ND: Not determined, activity of the enzyme being too low or undetectable in that cosolvent.

^c ND: Even at 5% of [BMIm][OctSO₄], the fluorescence signal decreased in a sigmoidal-shaped curve while temperature increased.

^d The fluorescence signal decreased as the temperature increased.

In the case of hDHFR, only small decreases were observed for all k_{cat}/K_M in organic cosolvents (2 to 6-fold) (Table 2-3). As observed for R67 DHFR, the catalytic efficiency of hDHFR was the highest in MeOH, followed in this case by DMF and DMSO, and is lowest in ACN and in [BMIm][BF₄]. The small increases observed in K_M for hDHFR might be explained by different accessibility of solvent molecules into the active site in order to interfere with catalysis. In contrast to R67 DHFR, the hDHFR active site cleft is protected by three loops that allow adoption of occluded and closed conformations upon substrate binding, formation of intermediates and release of products[48-49]. Those loops limit access of solvent molecules into the active site during the catalytic cycle, where one of the loops remains in a closed conformation[48-49]. At the widest point of the loop movements, the active site cleft opens by only ~ 3 Å.⁴⁸ This distance would allow water, MeOH or ACN to enter the active site but would not suffice to allow the larger DMF, DMSO, [BMIm][BF₄] or [BMIm][OctSO₄] molecules to

enter. Thus, active-site accessibility of cosolvents is probably more limited for hDHFR than R67 DHFR, consistent with the slighter effect on productive affinity for hDHFR than R67 DHFR.

Investigation of thermal stability revealed slight decreases in T_m in MeOH and ACN ($\Delta T_m = 1.1 - 1.5^\circ\text{C}$). Greater differences were observed in DMSO, DMF and [BMIm][BF₄] ($\Delta T_m = 2.5 - 4.4^\circ\text{C}$), reflecting structural destabilization (Table 2-4). We note that thermal denaturation was performed in only 5% DMF or [BMIm][BF₄], because 10% of those cosolvents resulted in an anomalous fluorescence signal, as seen for DMF with R67 DHFR. Our results demonstrate that hDHFR is more susceptible to thermal destabilisation by cosolvents than R67 DHFR. This is consistent with the lower thermostability of hDHFR ($T_m = 40.1^\circ\text{C}$) relative to R67 DHFR ($T_m = 53.7^\circ\text{C}$) under native conditions, suggestive in itself of greater thermosensitivity.

Overall, our results show that decreases in k_{cat}/K_M of both DHFRs in organic and IL cosolvents were mainly induced by increased K_M yet the mechanism underlying those changes differs for both DHFRs: cosolvents interfere with substrate binding to a greater extent in R67 DHFR while they result in greater thermal instability of hDHFR.

2.2.5. CONCLUSIONS

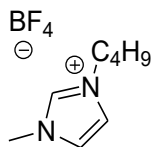
In conclusion, the preferred cosolvents for R67 DHFR are MeOH, ACN or [BMIm][OctSO₄] while hDHFR is most compatible with MeOH, DMSO, DMF, [BMIm][BF₄] or ACN. MeOH may offer the best compromise between retention of activity of both test enzymes (> 50%) with good capacity to solubilize test compounds and to verify known IC₅₀ values. DMSO and DMF remain reasonable alternatives to MeOH: although they reduced the activity of both DHFRs to a greater extent than MeOH, both DMSO and DMF solubilized almost all the selected compounds in mM range and were the only cosolvents tested that solubilized inhibitors **1** and **2**. Nonetheless, the high volatility of MeOH requires that screening protocols be modified, for instance by screening samples in smaller batches at a time. Furthermore, the low surface tension of MeOH must be accounted for by mechanisms such as pre-wetting tips, to ensure accurate and reproducible volume transfers. ILs were the least effective in solubilizing test compounds. Overall, the BMIm-based ILs investigated do not offer any clear advantage in screening hydrophobic compound libraries relative to organic cosolvents; while their low volatility can allow for longer working periods in open air than organic cosolvents, their higher cost is a further disadvantage. DMSO and DMF could thus be choice cosolvents for early-stage fragment screening where effective compound solubilisation is a primary concern. MeOH, however, is suited to screening more hydrophilic or more advanced compound generations where lower compound concentrations are required and where maintenance of native-like enzyme properties becomes the primary concern.

2.2.6. ACKNOWLEDGEMENTS

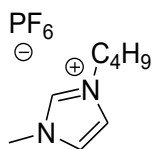
The authors thank Daniela Quaglia for helpful discussions. This work was supported by the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC), as well as PROTEO, the Québec Network for Research on Protein Structure, Function and Engineering, which is funded by les Fonds Québécois pour la Recherche sur la Nature et le Technologies (FRQ-NT). JLT, NK and DB received scholarships from PROTEO. JLT received a scholarship from Faculté des études supérieures et post-doctorales de l'Université de Montréal (FESP) and SMJA received a scholarship from Groupe de recherche universitaire sur le médicament (GRUM)-FESP.

2.2.7. SUPPORTING INFORMATION

¹H NMR data for 1-butyl-3-methylimidazolium tetrafluoroborate ([BMIm][BF₄]) and 1-butyl-3-methylimidazolium hexafluorophosphate ([BMIm][PF₆]):



1-butyl-3-methylimidazolium tetrafluoroborate: ¹H NMR (400 MHz, DMSO d₆): δ 9.04 (s, 1H), 7.73 (t, 1H, J= 1.77 Hz), 7.66 (t, 1H, J= 1.71 Hz), 4.15 (t, 2H, J= 7.15 Hz), 3.84 (s, 3H), 1.76 (m, 2H), 1.25 (sex., 2H, J=7.69 Hz), 0.89 (t, 3H, J=7.25 Hz). ¹³C NMR (100.6 MHz, DMSO d₆): δ 137.7, 124.8, 123.5, 49.8, 36.9, 32.6, 20, 14.5. ¹⁹F NMR (376.5 MHz, DMSO d₆): δ -149.7 (s, 4F).



1-butyl-3-methylimidazolium hexafluorophosphate: ¹H NMR (400 MHz, DMSO d₆): δ 9.07 (s, 1H), 7.73 (t, 1H, J= 1.76 Hz), 7.66 (t, 1H, J= 1.70 Hz), 4.15 (t, 2H, J= 7.18 Hz), 3.83 (s, 3H), 1.76 (m, 2H), 1.25 (sex., 2H, J= 7.56 Hz), 0.90 (t, 3H, J= 7.44 Hz). ¹³C NMR (100.6 MHz, DMSO d₆): δ 137.7, 124.8, 123.5, 49.8, 37, 32.6, 20, 14.5. ¹⁹F NMR (376.5 MHz, DMSO d₆): δ 71.6 (d, 6F, J= 709,8 Hz). ³¹P NMR (162.1 MHz, DMSO d₆): δ -143.5 (sept., 1P, J= 715.6 Hz).

Materials and methods for Table S 2-1 and Figure S 2-1

To test the solubilization capacity of solvents, 16 compounds were selected from the compound library previously screened against R67 DHFR[1]. The mainly hydrophobic compounds of molecular weight ranging between 150-250 g/mol were chosen so as to represent a diverse set of chemical features. For each compound, a volume of solvent was added and vortexed until a homogenous solution was obtained. If it did not dissolve, more solvent was added and vortexed until dissolution was achieved. The compounds were mixed with a spatula into the viscous [BMIm][OctSO₄] instead of vortexing.

To estimate the extent of partitioning of R67 DHFR into the aqueous phase, 200 nM R67 DHFR was incubated in phosphate buffer with 80% of [BMIM][PF₆] for 20 minutes. An aliquot was taken from the aqueous phase of the [BMIM][PF₆] sample and applied on Tricine-SDS-PAGE for comparison of known quantities of R67 DHFR. Band intensity was analyzed by Scion Image version 2.0 for Windows (Scion Corporation, Frederick, Maryland, www.scioncorp.com, now defunct).

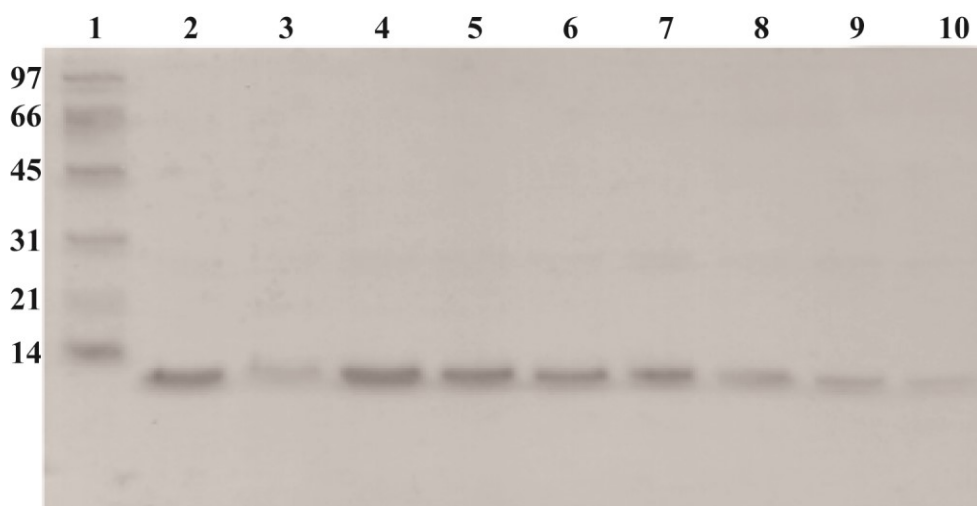
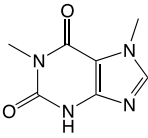

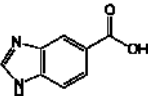


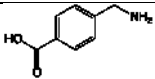
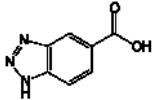
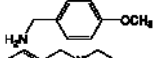
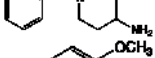

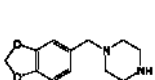
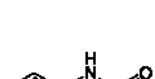
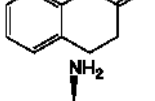

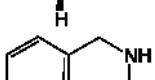
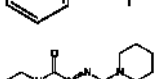
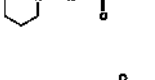
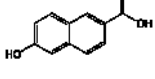
Figure S 2-1 Tricine-SDS-PAGE of R67 DHFR incubated with the IL [BMIm][PF₆].

1: Molecular weight standards (kDa); 2, 4 – 10: control R67 DHFR: 4.0, 3.5, 3.0, 2.5, 2.0, 1.5, 1.0 and 0.5 μ g, respectively; 3: R67 DHFR remaining in the aqueous phase following 20 min of incubation with 80% [BMIm][PF₆]. The band intensity of sample 3 corresponds to approximately 1.5 μ g of R67 DHFR remaining, where 4.0 μ g of R67 DHFR had been added prior to incubation.

Table S 2-1 Solubility of compounds in crude solvents.

The maximum concentration of compound solubilized is shaded as follows: (□) ≥ 0.5 M; (▤) 0.1-0.5 M; (▥) < 0.1 M; (■) insoluble at the concentration indicated.

Structure	ACN (M)	DMSO (M)	MeOH (M)	DMF (M)	[BMIm][OctSO ₄] (M)	[BMIm][BF ₄] (M)
	0.031	0.099	0.029	0.014	0.046	0.042
	1.4	1.4	1.4	1.4	1.3	1.4
	0.042	0.038	0.036	0.056	0.16	0.036

	0.040	0.023	0.029	0.053	0.073	0.066
	0.067	0.037	0.083	0.032	0.15	0.037
	0.80 ^a	1.8	1.4	1.3	1.3	1.4
	0.83 ^a	0.60	0.79	0.81	0.82	0.72
	0.15	0.15	0.67	0.30	0.13	0.17
	0.11	0.052	0.050	0.082	0.082	0.052
	0.049	0.56	0.053	0.13	0.082	0.041
	0.029	0.036	0.062	0.034	0.050	0.037
	1.7	1.7	1.3	1.2	1.3	1.3
	0.14	0.063	0.14	0.19	0.048	0.081
	0.050	0.18	0.27	0.17	0.12	0.15
	0.034	0.034	0.022	0.041	0.069	0.026
	0.047	0.040	0.065	0.030	0.035	0.042

^a Compound in liquid form that precipitated upon addition of the solvent.

2.2.8. REFERENCES (Chapitre 2)

1. Bastien, D.; Ebert, M. C. C. J. C.; Forge, D.; Toulouse, J.; Kadnikova, N.; Perron, F.; Mayence, A.; Huang, T. L.; Vanden Eynde, J. J.; Pelletier, J. N., Fragment-Based Design of Symmetrical Bis-benzimidazoles as Selective Inhibitors of the Trimethoprim-Resistant, Type II R67 Dihydrofolate Reductase. *J Med Chem* **2012**, *55* (7), 3182-3192.
2. Howell, E. E., Searching Sequence Space: Two Different Approaches to Dihydrofolate Reductase Catalysis. *ChemBioChem* **2005**, *6* (4), 590-600.
3. Grubbs, J.; Rahmanian, S.; DeLuca, A.; Padmashali, C.; Jackson, M.; Duff, M. R.; Howell, E. E., Thermodynamics and solvent effects on substrate and cofactor binding in escherichia coli chromosomal dihydrofolate reductase. *Biochemistry* **2011**, *50* (18), 3673-3685.
4. Chopra, S.; Dooling, R. M.; Horner, C. G.; Howell, E. E., A balancing act between net uptake of water during dihydrofolate binding and net release of water upon NADPH binding in R67 dihydrofolate reductase. *J Biol Chem* **2008**, *283* (8), 4690-4698.
5. Assaraf, Y. G., Molecular basis of antifolate resistance. *Cancer Metast Rev* **2007**, *26*, 153-181.
6. Nammalwar, B.; Bourne, C. R.; Bunce, R. A.; Wakeham, N.; Bourne, P. C.; Ramnarayan, K.; Mylvaganam, S.; Berlin, K. D.; Barrow, E. W.; Barrow, W. W., Inhibition of bacterial dihydrofolate reductase by 6-Alkyl-2,4-diaminopyrimidines. *ChemMedChem* **2012**, *7* (11), 1974-1982.
7. Arooj, M.; Sakkiyah, S.; Cao, G. P.; Lee, K. W., An innovative strategy for dual inhibitor design and its application in dual inhibition of human thymidylate synthase and dihydrofolate reductase enzymes. *PloS One* **2013**, *8* (4).
8. Morphy, J. R.; Harris, C. J., Chemoinformatic approaches to target identification. In *Designing multi-target drugs*, The Royal Society of Chemistry: Cambridge, UK, 2012; pp 50-65.
9. Zhang, X.; Zhou, X.; Kisliuk, R. L.; Piraino, J.; Cody, V.; Gangjee, A., Design, synthesis, biological evaluation and X-ray crystal structure of novel classical 6,5,6-tricyclic benzo 4,5 thieno 2,3-d pyrimidines as dual thymidylate synthase and dihydrofolate reductase inhibitors. *Bioorg Med Chem* **2011**, *19* (11), 3585-94.
10. Abali, E. E.; Skacel, N. E.; Celikkaya, H.; Hsieh, Y.-C., Regulation of human dihydrofolate reductase activity and expression. *Vitam Horm* **2008**, *79* (08), 267-92.
11. Doukyu, N.; Ogino, H., Organic solvent-tolerant enzymes. *Biochem Eng J* **2010**, *48* (3), 270-282.
12. Okazaki, S.; Goto, M.; Furusaki, S., Surfactant-protease complex as a novel biocatalyst for peptide synthesis in hydrophilic organic solvents. *Enzyme Microb Tech* **2000**, *26* (2-4), 159-164.
13. Chertkov, V. A.; Shestakova, A. K.; Kisin, A. V.; Yaropolov, A. I., Enzymatic Polymerization of Dihydroquercetin Using Bilirubin Oxidase. *Biochemistry* **2015**, *80* (2).
14. Karinen, R.; Iestad, E. L.; Andresen, W.; Smith-Kielland, A.; Christophersen, A., Comparison of the stability of stock solutions of drugs of abuse and other drugs stored in a freezer, refrigerator, and at ambient temperature for up to one year. *J Anal Toxicol* **2011**, *35* (8), 583-590.

15. Pinto, P. C.; Saraiva, M. L.; Lima, J. L., Oxidoreductase behavior in ionic liquids: a review. *Anal Sci* **2008**, *24* (10), 1231-1238.
16. Domínguez de María, P., Ionic liquids in biotransformations and organocatalysis: Solvents and beyond. In *Ionic liquids as (co-)solvents for nonhydrolytic enzymes*, John Wiley & Sons: Hoboken, NJ, 2012.
17. Muginova, S. V.; Galimova, A. Z.; Polyakov, A. E.; Shekhovtsova, T. N., Ionic liquids in enzymatic catalysis and biochemical methods of analysis: Capabilities and prospects. *J Anal Chem* **2010**, *65* (4), 331-351.
18. van Rantwijk, F.; Sheldon, R. A., Biocatalysis in ionic liquids. *Chem Rev* **2007**, *107*, 2757-2785.
19. Gonzalo, G.; Lavandera, I.; Durchschein, K.; Wurm, D.; Faber, K.; Kroutil, W., Asymmetric biocatalytic reduction of ketones using hydroxy-functionalized water-miscible ionic liquids as solvents. *Tetrahedron Asymmetry* **2007**, *18*, 2541-2546.
20. Tavares, A. P. M.; Rodriguez, O.; Macedo, E. A., Ionic liquids as alternative co-solvents for laccase: study of enzyme activity and stability. *Biotechnol Bioeng* **2008**, *101*, 201-207.
21. Lou, W.-Y.; Zong, M.-H.; Liu, Y.-Y.; Wang, J.-F., Efficient enantioselective hydrolysis of D,L-phenylglycine methyl ester catalyzed by immobilized *Candida antarctica* lipase B in ionic liquid containing systems. *J Biotechnol* **2006**, *125*, 64-74.
22. Yang, Z., Hofmeister effects: an explanation for the impact of ionic liquids on biocatalysis. *J Biotechnol* **2009**, *144* (1), 12-22.
23. Chefson, A.; Auclair, K., CYP3A4 activity in the presence of organic cosolvents, ionic liquids, or water-immiscible organic solvents. *ChemBioChem* **2007**, *8*, 1189-1197.
24. Noujeim, N.; Leclercq, L.; Schmitzer, A. R., N,N'-disubstituted methylenediimidazolium salts: A versatile guest for various macrocycles. *J Org Chem* **2008**, *73* (10), 3784-3790.
25. Volpato, J. P.; Yachnin, B. J.; Blanchet, J.; Guerrero, V.; Poulin, L.; Fossati, E.; Berghuis, A. M.; Pelletier, J. N., Multiple conformers in active site of human dihydrofolate reductase F31R/Q35E double mutant suggest structural basis for methotrexate resistance. *J Biol Chem* **2009**, *284* (30), 20079-20089.
26. Schmitzer, A. R.; Lépine, F.; Pelletier, J. N., Combinatorial exploration of the catalytic site of a drug-resistant dihydrofolate reductase: Creating alternative functional configurations. *Protein Eng Des Sel* **2004**, *17* (11), 809-819.
27. Schagger, H.; von Jagow, G., Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Anal Biochem* **1987**, *166* (2), 368-379.
28. Baccanari, D.; Phillips, A.; Smith, S.; Sinski, D.; Burchall, J., Purification and properties of *Escherichia coli* dihydrofolate reductase. *Biochemistry* **1975**, *14*, 5267-5273.
29. Trindade, J. R.; Visak, Z. P.; Blesic, M.; Marrucho, I. M.; Lopes, N. C.; Rebelo, L. P. N., Salting-Out Effects in Aqueous Ionic Liquid Solutions : Cloud-Point Temperature Shifts. *J Phys Chem B* **2007**, *111*, 4737-4741.
30. Fossati, E.; Volpato, J. P.; Poulin, L.; Guerrero, V.; Dugas, D. A.; Pelletier, J. N., 2-tier bacterial and in vitro selection of active and methotrexate-resistant variants of human dihydrofolate reductase. *J Biomol Screen* **2008**, *13* (6), 504-514.

31. Simeonov, A., Recent developments in the use of differential scanning fluorometry in protein and small molecule discovery and characterization. *Expert Opin Drug Discov* **2013**, 8 (9), 1071-1082.
32. Ebert, M. C. C. J. C.; Morley, K. L.; Volpato, J. P.; Schmitzer, A. R.; Pelletier, J. N., Asymmetric mutations in the tetrameric R67 dihydrofolate reductase reveal high tolerance to active-site substitutions. *Protein Sci* **2015**, 24 (4), 495-507.
33. Takcs, B.; Nagy, L.; Kollr, L.; Nagy, G., Investigation of Oxidoreductase Enzyme Catalysis in Water-Ionic Liquid (IL) Solvent Mixtures. *Anal Lett* **2010**, 43 (10-11), 1734-1745.
34. Lutz-Wahl, S.; Trost, E. M.; Wagner, B.; Manns, A.; Fischer, L., Performance of D-amino acid oxidase in presence of ionic liquids. *J Biotechnol* **2006**, 124 (1), 163-71.
35. Paul, C. E.; Lavandera, I.; Gotor-Fernandez, V.; Gotor, V., Imidazolium-based ionic liquids as non-conventional media for alcohol dehydrogenase-catalysed reactions. *Top Catal* **2013**, 57 (5), 332-338.
36. Mohammad, A.; Inamuddin, D., Green Solvents II: Properties and Applications of Ionic Liquids. In *Stability and Activity of Enzymes in Ionic Liquids*, Springer: New York, London, 2012; pp 235-274.
37. Sheldon, R. A., Biocatalysis and biomass conversion in alternative reaction media. *Chemistry* **2016**, 22, 12984-12999.
38. Ratel, M.; Provencher-Girard, A.; Zhao, S. S.; Breault-Turcot, J.; Labrecque-Carbonneau, J.; Branca, M.; Pelletier, J. N.; Schmitzer, A. R.; Masson, J. F., Imidazolium-based ionic liquid surfaces for biosensing. *Anal Chem* **2013**, 85 (12), 5770-5777.
39. Holland, J. C.; Linn, C. E.; DiGiammarino, E.; Nichols, R.; Howell, E. E., Does R67 dihydrofolate reductase possess a proton donor? *Adv Exp Med Biol* **1993**, 338, 493-498.
40. Abraham, M. H.; Zissimos, A. M.; Huddleston, J. G.; Willauer, H. D.; Rogers, R. D.; Acree, W. E., Some novel liquid partitioning systems: Water-ionic liquids and aqueous biphasic systems. *Ind Eng Chem Res* **2003**, 42 (3), 413-418.
41. Abraham, M. H.; Zissimos, A. M.; Acree, W. E., Partition of solutes into wet and dry ethers; an LFER analysis. *New J Chem* **2003**, 27 (7), 1041-1044.
42. Hopkins, A. L.; Keser, The role of ligand efficiency metrics in drug discovery. *Nat Rev Drug Discov* **2014**, 13 (2), 105-21.
43. Ciulli, A., Protein-ligand interactions. In *Biophysical Screening for the Discovery of Small-Molecule Ligands*, Springer: Totowa, NJ, 2013; pp 357-388.
44. Zhang, S.; Wang, J.; Zhao, Q.; Zhou, Q., Structures and interactions of ionic liquids. In *Aggregation in Systems of Ionic Liquids*, Springer: Berlin, Heidelberg, 2014; pp 39-77.
45. Zhuang, P.; Yin, M.; Holland, J. C.; Peterson, C. B.; Howell, E. E., Artificial duplication of the R67 dihydrofolate reductase gene to create protein asymmetry: Effects on protein activity and folding. *J Biol Chem* **1993**, 268 (30), 22672-22679.
46. Chopra, S.; Lynch, R.; Kim, S. H.; Jackson, M.; Howell, E. E., Effects of temperature and viscosity on R67 dihydrofolate reductase catalysis. *Biochemistry* **2006**, 45 (21), 6596-6605.
47. Park, H. Y.; Zhuang, P.; Nichols, R.; Howell, E. E., Mechanistic studies of R67 dihydrofolate reductase - Effects of pH and an H62C mutation. *J Biol Chem* **1997**, 272 (4), 2252-2258.
48. Schnell, J. R.; Dyson, H. J.; Wright, P. E., Structure, dynamics, and catalytic function of dihydrofolate reductase. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* **2004**, 33, 119-140.

49. Bhabha, G.; Ekiert, D. C., Divergent evolution of protein conformational dynamics in dihydrofolate reductase. *Nat Struct Mol Biol* **2013**, *20* (11), 1-25.

Chapitre 3 - Développement d'une plateforme de criblage de la DHFR R67 en SPR

3.1. Préface

Face à la résistance intrinsèque au TMP conférée par la DHFR R67, il s'avère d'intérêt de développer des inhibiteurs de la DHFR R67 afin de contrer les infections bactériennes. Les premiers inhibiteurs de la DHFR R67 furent rapportés par notre groupe en 2012[1] en utilisant une technique biochimique (effet de l'inhibition d'un composé sur l'activité enzymatique). Ces inhibiteurs possèdent des K_I de l'ordre du micromolaire; il serait souhaitable d'en découvrir de nouveaux offrant une meilleure affinité.

Pour ce faire, le chapitre 2 présentait une étude effectuée afin de trouver le co-solvant adéquat pour le développement d'une méthode de criblage de la DHFR R67 comme enzyme cible et de la hDHFR comme enzyme contrôle. Le chapitre 2 décrivait donc les conditions de criblage à utiliser dans le cas de techniques biochimiques.

Or, les techniques biochimiques et biophysiques sont deux techniques apportant des informations complémentaires, ce qui en fait des techniques orthogonales permettant de réduire significativement les faux positifs concernant l'identification d'inhibiteurs intéressants. Il est donc important que les conditions de criblage utilisées dans les deux techniques orthogonales soient les mêmes afin de pouvoir être utilisées conjointement. Par conséquent, le chapitre 3 comprend la technique biophysique étudiée (SPR) en considérant la condition optimale ayant été déterminée pour un criblage basé sur une technique biochimique au chapitre 2 (10% DMSO).

Ainsi, le présent chapitre comprend deux sections présentant les deux approches qui ont été testées afin de développer une plateforme de criblage en SPR pour la caractérisation d'inhibiteurs de la DHFR R67.

3.2. Approche A : Essai compétitif impliquant les FA@AuNPs et la DHFR R67 immobilisée

3.2.1. Concept, avantages et inconvénients

L'objectif du projet de recherche est de développer une plateforme de criblage en SPR pour la caractérisation d'inhibiteurs de la DHFR R67 et ainsi éventuellement en découvrir de nouveaux. La première approche considérée (approche A, Figure 3-1) se base sur la compétition entre des nanoparticules d'or fonctionnalisées avec l'acide folique (FA: AuNPs) libres en solution comme amplificateurs de signaux SPR (compétiteur 1) et un inhibiteur potentiel libre en solution (compétiteur 2) pour le site actif de l'enzyme immobilisée sur un prisme. Le développement sera entrepris avec un inhibiteur connu (Figure 3-2). La Figure 3-3 présente le signal attendu en LSPR selon l'approche A. À la première étape de l'essai, il est attendu que les FA: AuNPs s'associent au site actif de l'enzyme DHFR R67 libre en solution, générant un déplacement bathochromique de λ_{LSPR} des NPs d'or. Ensuite, l'ajout de l'inhibiteur (*DHFR34*) délogera les FA: AuNPs liées à l'enzyme, générant ainsi un déplacement hypsochromique de λ_{LSPR} . Le déplacement de λ_{LSPR} des FA: AuNPs pour l'enzyme libre en solution sera le même qu'en SPR pour l'enzyme immobilisée (suivi du déplacement de λ_{SPR} du prisme d'or).

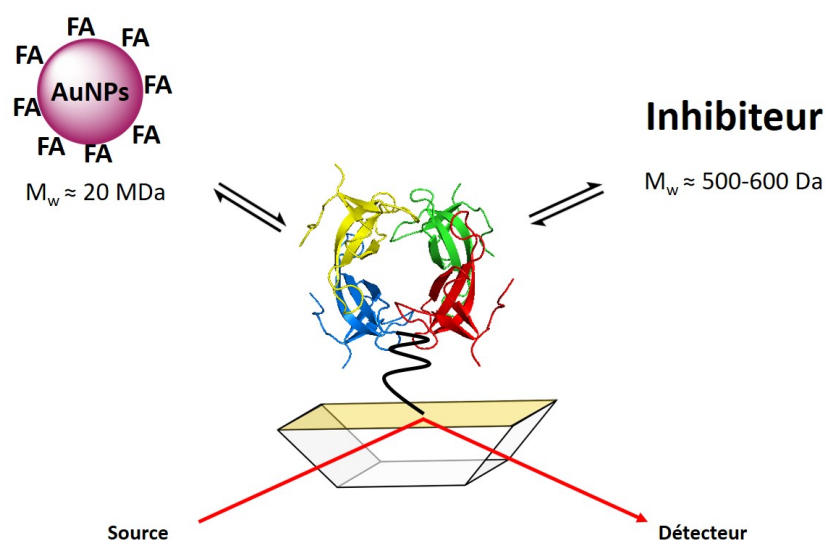


Figure 3-1 Configuration du système pour l'approche A

Première approche (approche A) pour le développement d'un essai de criblage compétitif en SPR. Les AuNPs fonctionnalisées à l'FA entrent en compétition avec des inhibiteurs potentiels libres en solution pour le site actif de la DHFR R67 immobilisée sur un prisme recouvert d'or.

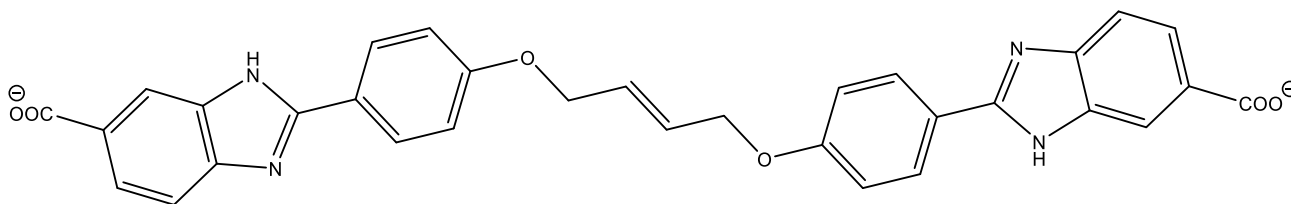


Figure 3-2 Structure de l'inhibiteur *DHFR34* de la *DHFR R67*

L'inhibiteur DHFR34 de l'enzyme DHFR R67 (560.6 g/mol; $K_i = 2.4 \mu\text{M}$) (J. L. Toulouse, D. Forge, J.-J. Vanden Eynde, J. N. Pelletier, données non publiées).

Nombreux sont les avantages de cette approche. Premièrement, l'immobilisation d'enzymes avec une queue d'histidines (His-tag) sur des surfaces d'or modifiées avec un peptide chélatant est bien développée [2-4]. Ainsi, il ne manque qu'à vérifier si la *DHFR R67* immobilisée demeure active afin d'être en mesure de lier les FA:AuNPs et l'inhibiteur *DHFR34*.

Deuxièmement, il est attendu que le signal SPR généré par la liaison des FA:AuNP sera significatif étant donnée la masse importante des FA:AuNPs (environ 20 MDa, donc largement supérieur à la limite de détection de 1000 Da en SPR[5]). Ainsi, les FA:AuNPs agissent comme amplificateur de signal SPR pour tester les inhibiteurs potentiels de la *DHFR R67* dont le poids moléculaire est inférieur à 1000 Da.

Néanmoins, la SPR est sujette à des artéfacts générés par des interactions non-spécifiques et elle requiert une optimisation pour n'observer que le signal désiré (Tableau 1-3). S'il existe des interactions non-spécifiques significatives entre les FA:AuNPs et l'inhibiteur, par exemple, il pourrait être difficile d'obtenir une interprétation fidèle des signaux SPR reflétant l'affinité de l'inhibiteur avec sa cible. Ainsi, nous avons choisi de procéder à des expériences LSPR (Figure 3-3) en premier lieu afin de valider l'approche A sans utiliser de prismes (Figure 3-1). Bien que les prismes permettent d'amplifier le signal relativement au signal LSPR, leur confection est relativement complexe et requiert l'étape d'immobilisation de la *DHFR R67*. Ici, nous suivrons la compétition en LSPR avec la cible libre avant de procéder aux tests de criblage par SPR avec la cible immobilisée.

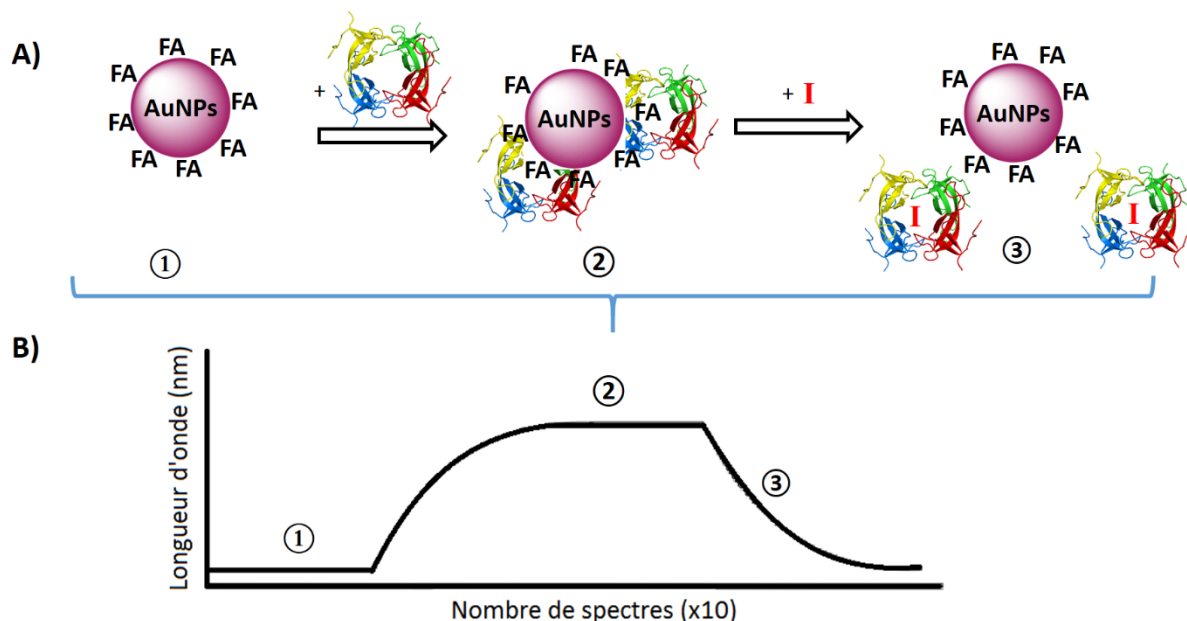


Figure 3-3 Résultats attendus pour le criblage par l'approche A

Mécanisme (panneau A) et signal LSPR (panneau B) attendus lors de l'essai de criblage compétitif pour l'approche A. Lors de l'ajout de la cible DHFR R67 dans une solution de FA:AuNPs (étape 1), la liaison entre les FA:AuNPs et la DHFR R67 génère un déplacement bathochromique en LSPR (étape 2). L'ajout d'un excès d'inhibiteur avec une affinité significative pour la DHFR R67 produira la dissociation des FA:AuNPs, générant un déplacement hypsochromique d'une amplitude semblable au déplacement bathochromique précédent (étape 3).

3.2.2. Partie expérimentale

Synthèse des AuNPs

Les AuNPs fonctionnalisées de façon non covalentes au citrate (cit:AuNPs) ont été synthétisées puis fonctionnalisées avec de l'FA (Sigma Aldrich) selon un protocole établi [6]. Brièvement, du chlorure d'au(III) trihydraté ($\text{HAu(III)Cl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, Sigma Aldrich) a été réduit à l'au(0) par le citrate de sodium (Na_3Ct , Fisher Scientific) (agent réducteur et stabilisant) [7] sous agitation et par reflux pendant 10 minutes. Les cit:AuNPs sont ensuite quantifiées et caractérisées selon la méthode de Haiss, *et al.*[8]. À la Figure 3-4, les λ_{max} ainsi que leur valeur d'absorbance correspondantes, furent utilisés pour calculer le diamètre (taille) ainsi que la concentration des cit:AuNPs en utilisant la loi de Beer-Lambert ainsi que des valeurs de coefficients d'absorption ϵ de références tel que montré par Haiss, *et al.*[8]. Les tailles et les concentrations des cit:AuNPs se situaient généralement entre 15-23 nm et 1.5-10 nM,

respectivement. Ceci est cohérent avec les résultats de la littérature [7], où la synthèse avec le citrate fournit des cit:AuNPs avec des diamètres généralement autour de 20 nm.

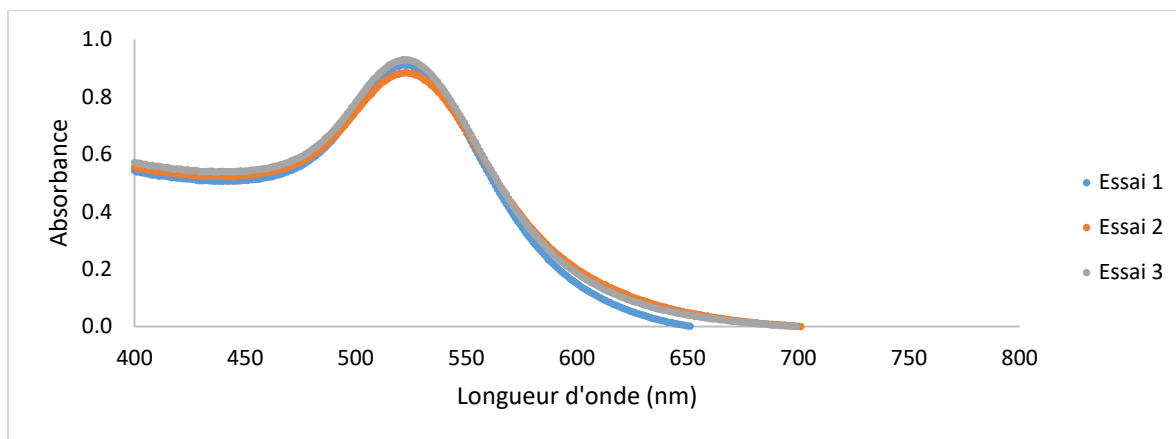


Figure 3-4 Exemple type de la caractérisation des cit:AuNPs synthétisées.

Absorbance des cit:AuNPs, mesurée en triplicata. Les valeurs de λ_{SPR} obtenues (ou λ_{max}) sont de 521 nm, 523 nm et 521 nm, alors que leurs valeurs d'absorbance correspondantes (A_{max}) sont respectivement de 0,913, 0,885 et 0,930.

L'étape de fonctionnalisation avec FA consiste à centrifuger les cit:AuNPs 1×8 min à 11 000 rpm afin d'enlever l'excès de citrate provenant de la synthèse des cit:AuNPs. Ensuite, on expose les cit:AuNPs (~ 1 nM) en suspension dans l'eau à un excès de FA (800 μ M), sous agitation continue et à l'abri de la lumière. Les FA:AuNPs obtenues sont centrifugées 2×8 min, à 11 000 rpm puis suspendues dans le tampon d'intérêt.

Une optimisation du temps de fonctionnalisation pour maximiser la fonctionnalisation a été faite. Les spectres d'absorbance FA:AuNPs ont montré un déplacement bathochromique de 4 nm et de 5 nm de la λ_{SPR} par rapport aux cit:AuNPs de départ pour 30 min (Figure 3-5) et 18 h de fonctionnalisation, respectivement, ce qui suggère le succès de la fonctionnalisation. Par conséquent, le temps de fonctionnalisation fut établi à une heure au maximum. De plus, le fait de n'observer qu'une bande d'absorption maximale confirme que les FA:AuNPs sont sphériques.

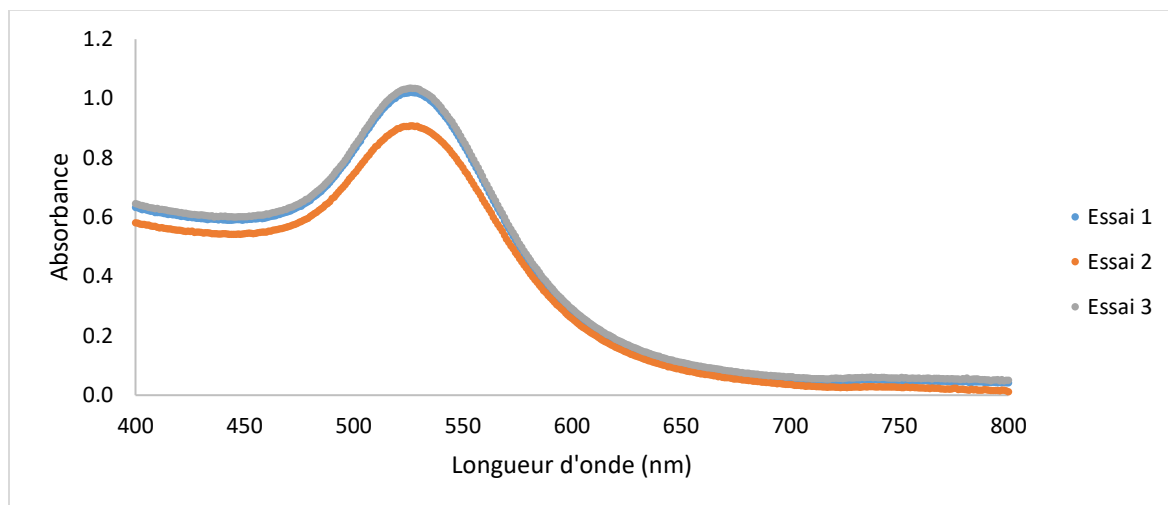


Figure 3-5 Exemple type de la caractérisation des FA:AuNPs suite à 30 min de fonctionnalisation à l'FA
Absorbance des FA:AuNPs fonctionnalisées, mesurée en triplicata. Les valeurs de λ_{SPR} (ou λ_{max}) pour les réplicats 1 à 3 sont respectivement 526 nm, 526 nm et 526 nm, alors que leurs valeurs d'absorbance correspondantes (A_{max}) sont respectivement de 1.02, 0.91 et 1.04.

Production et caractérisation de l'enzyme cible DHFR R67

La DHFR R67 portant une queue de six histidines (His-tag) a été produite et caractérisée selon un protocole établi [1]. L'activité enzymatique (en U/mg, voir le Chapitre 2) est vérifiée afin d'assurer que l'enzyme conserve l'intégrité de son site actif afin de lier FA et inhibiteurs. L'enzyme fut entreposée en aliquots à -80°C . Une fois dégelée et maintenue sur glace au cours des expériences SPR, nous avons observé une diminution de l'activité enzymatique d'environ 20% pendant 4 h. Afin que cette perte ne nuise pas à l'interprétation des résultats, les expériences ne duraient pas plus de 4 h en moyenne. Il est important que l'enzyme conserve le plus son activité enzymatique native, étant donné que celle-ci sera réduite par l'ajout de 10% de DMSO (Chapitre 2).

Montage et conditions des expériences LSPR

Les expériences LSPR ont été effectuées sur un montage ouvert comportant un spectrophotomètre (Figure 3-6) et incluant les composantes montrées à la Figure 1-16. Les données brutes générées lors des expériences ont été analysées en utilisant des algorithmes spécifiques dans le logiciel *MatLab*® (voir Annexe, Section B) afin de générer des graphiques de cinétiques LSPR.

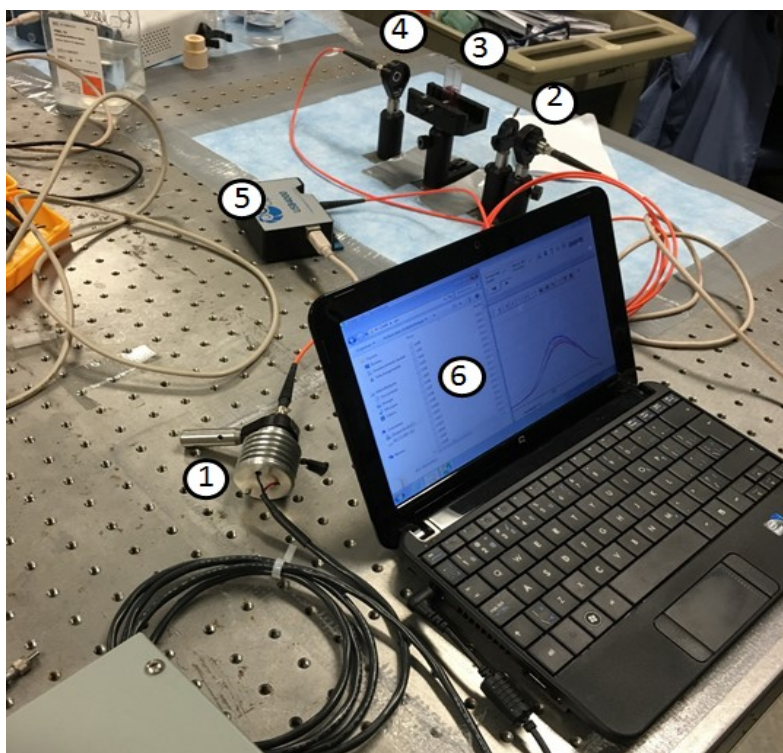


Figure 3-6 Installation ouverte utilisée pour des mesures en LSPR

Cette installation est composée d'une source lumineuse (1) d'une intensité réglée à $\sim 0,217$ Watt, d'une fente ajustable (2) contrôlant la quantité de lumière transmise à l'échantillon dans la cuvette (3), une fibre optique (4) pour diriger et condenser la lumière transmise au détecteur spectrophotométrique (5) et d'un ordinateur (6) collectant les données.

Certaines procédures expérimentales ont été optimisées afin d'améliorer la qualité des résultats en LSPR. Premièrement, il fut noté qu'une homogénéisation à l'aide d'une pipette Pasteur était requise suite à l'ajout de l'enzyme étant donné la densité élevée de cette solution et le faible volume (0.6% du volume total) ajouté (Figure 3-7B). La Figure 3-7A illustre une courbe de cinétique LSPR avec et sans homogénéisation; notons que le fait de mélanger prévient également le dépôt des NPs, observé à la fin de la mesure cinétique en absence de mélange. Cette précipitation des NP ne se produisait qu'après l'ajout de l'enzyme. Par conséquent, l'étape d'homogénéisation fut appliquée à chaque étape afin d'assurer des signaux LSPR bien définis.

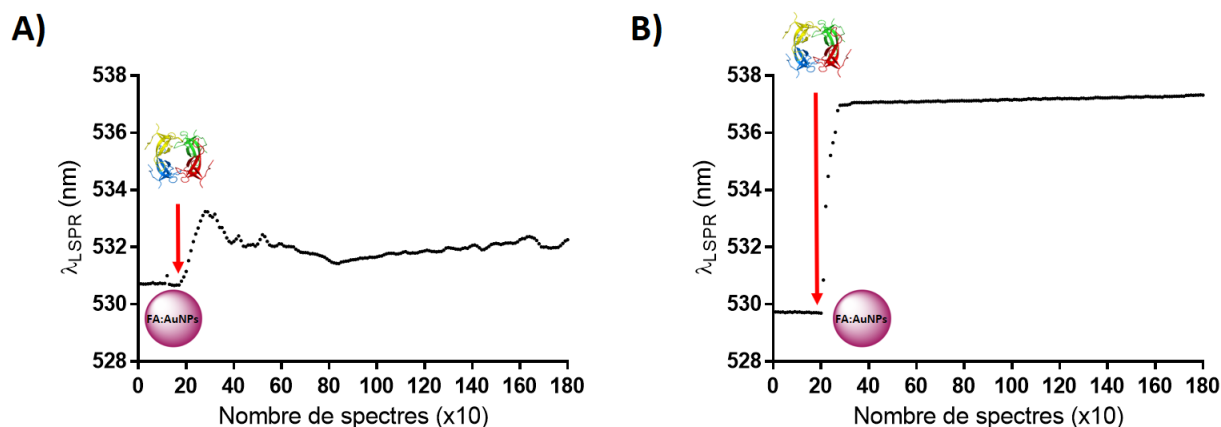


Figure 3-7 Effet de l'homogénéisation de l'échantillon lors des cinétiques LSPR

Déplacement LSPR (bathochromique) causé par la liaison des FA:AuNPs à la DHFR R67 lorsque le mélange est (a) non homogénéisé (b) homogénéisé suite à l'ajout de l'enzyme.

Deuxièmement, toutes les solutions impliquées furent additionnées de DMSO (concentration finale de 10%) afin de compenser pour les variations d'indices de réfraction causées par la présence du DMSO. Le DMSO est requis pour solubiliser les inhibiteurs. Cette procédure fut nécessaire afin d'obtenir des variations de λ_{LSPR} représentatifs des phénomènes physiques se produisant durant la compétition. La Figure 3-8A illustre que le déplacement bathochromique observé par l'addition de l'inhibiteur en 10% de DMSO est dû majoritairement à l'introduction du DMSO dans le milieu, masquant ainsi les phénomènes physiques de liaison. Il faut noter que le nombre de spectres acquis à la Figure 3-8B est différent de celui de la Figure 3-8A, car le nombre de spectres (donc la durée de l'expérience) pouvait être diminué de moitié tout en obtenant une stabilisation immédiate du signal LSPR à la suite d'un ajout de solution dans la cuvette.

Il est connu que le plasmon des AuNPs est sensible aux changements de l'indice de réfraction du milieu [9]. En effet, de faibles variations de l'indice de réfraction du milieu génèrent de très grandes variations de la valeur λ_{LSPR} pour les AuNPs. Ainsi, s'assurer d'avoir 10% de DMSO dans toutes les solutions permet donc d'interpréter des $\Delta\lambda_{\text{LSPR}}$ uniquement générés par des phénomènes de compétition.

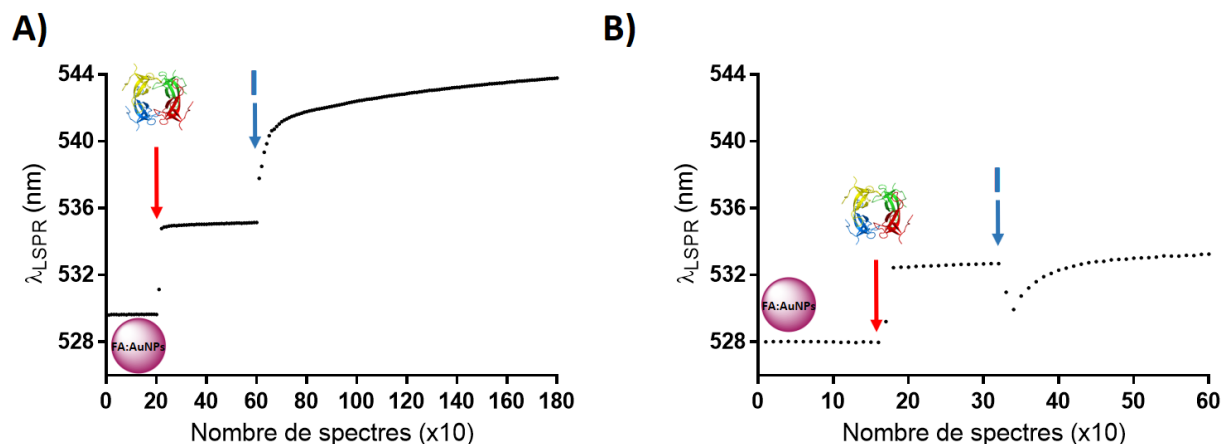


Figure 3-8 Effet d'une dilution directe à 10% de DMSO lors de la cinétique LSPR comparée à l'utilisation de solution déjà diluée à 10% DMSO

Déplacement LSPR bathochromique des FA:AuNPs solubilisées en tampon KPO_4 50 mM, pH=7. Ajout de DHFR R67 au 200^e spectre, puis addition d'inhibiteur DHFR34 en DMSO (10%, concentration finale) au 600^e spectre ($n = 4$). (B) Déplacement LSPR bathochromique des FA:AuNPs solubilisées en tampon 10% DMSO/ KPO_4 50 mM, pH=7. Ajout de DHFR R67 au 150^e spectre, puis addition d'inhibiteur DHFR34 solubilisé en tampon 10% DMSO/ KPO_4 50 mM, pH=7 au 300^e spectre ($n = 4$).

Enfin, la fonctionnalisation des AuNPs fut améliorée simplement en combinant les aliquots suite à la synthèse. L'aliquotage simplifie les manipulations; toutefois, de légères différences de fonctionnalisation donnent lieu à des aliquots possédant des tailles de AuNPs légèrement variées. Cette variation suffit pour générer une différence de λ_{LSPR} significative, observable en début de cinétique avant l'ajout d'autres composantes (Figure 3-9). Il est à noter que l'augmentation du signal particulièrement à la Figure 3-9B serait causée par une légère agrégation des FA:AuNPs avec le temps, ce qui est commun pour des NPs dont la stabilité en solution n'est pas optimale. Par conséquent, les FA:AuNPs de la Figure 3-7B sont différentes des FA:AuNPs à la Figure 3-9B, ce qui en résulte en des signaux LSPR différents. Ces différences de fonctionnalisations seront abordées en détail à la section 3.2.3.1. Ainsi, cette manipulation supplémentaire aide à la cohérence des résultats obtenus et à compenser pour les variations inévitables de taille des AuNPs.

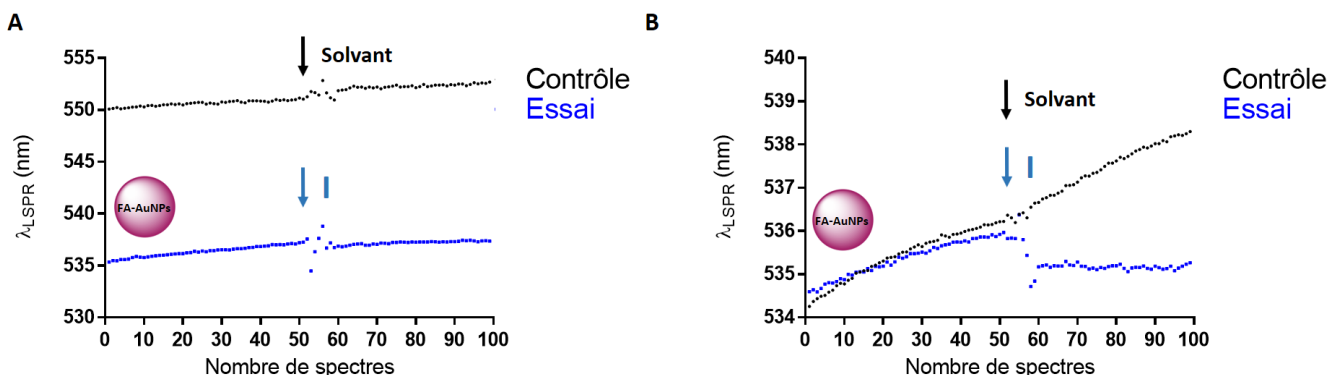


Figure 3-9 Effet de la combinaison des aliquots de FA:AuNPs fonctionnalisés

Signal LSPR de AuNPs fonctionnalisées de la même façon, (A) sans et (B) avec une combinaison au préalable de l'aliquot de contrôle avec celui d'un essai effectué en triplicata (essai). L'écart entre la valeur initiale de λ_{SPR} entre le contrôle et les répliquats est ainsi atténué. Les variations de signaux aux 60^e spectres en (A) et (B) sont dues à une agitation manuelle du contenu de la cuvette.

Caractérisation de la His-tag DHFR R67 immobilisée

Une vérification du maintien de l'activité de l'enzyme DHFR R67 suite à son immobilisation sur une surface d'or est nécessaire afin de procéder à un essai compétitif en SPR selon l'approche A. L'activité spécifique de l'enzyme His-tag DHFR R67 immobilisée a été suivie sur une puce (plaque ou lamelle recouverte d'or de 9×9 mm). Les surfaces ont été préparées en déposant du chrome (~ 1 nm d'épaisseur) puis de l'or (~ 50 nm d'épaisseur) sur la surface de verre en utilisant l'appareil de déposition par pulvérisation Cressington 308R (Tel Pella Inc.). Les expériences de détection SPR ont été réalisées dans une configuration de Kretschmann (Figure 1-7). Les surfaces d'or ont été immergées dans une solution de 1 mg/mL de peptide 3-mercaptopropionyl-leuciny-l-histidinyl-aspartyl-leuciny-l-histidinyl-acide aspartique (3-MPA-LHDLHD-OH) solubilisé dans l'EtOH pour former une monocouche auto-assemblée (SAM) qui prévient l'entartrage de la surface[10-11]. La SAM a été fonctionnalisée avec de l'acide nitriloacétique-cuivre (NTA-Cu²⁺) pour générer du Au-3-MPA-LHDLHD-NTA-Cu²⁺ tel que publié[12]. Pour l'immobilisation de l'enzyme, les plaques fonctionnalisées préalablement avec une SAM ont été placées sur un prisme de Dove (au-dessus d'une couche mince d'huile à immersion) et scellées avec un anneau de caoutchouc ajusté dans le module d'injection tel que montré à la Figure 3-10. La His-tag DHFR R67 a été ensuite immobilisée par la coordination du motif His-tag terminal au Cu²⁺ (Figure 3-11).

Chapitre 3 : Développement d'une plateforme de criblage

La surface de la puce ainsi fonctionnalisée est rincée avec de l'eau puis avec du tampon (KPO_4 50 mM, $\text{pH}=7.0$). Suite à l'ajustement de la bande plasmonique (avec un minimum typique à environ 620 nm), la ligne de base a été ajustée en polarisation S puis la référence a été mesurée (avec une moyenne de 10 balayages/aquisition pour un total de 100 balayages). Le $\Delta\lambda_{\text{SPR}}$ a été ensuite mesuré en polarisation P. La puce a été rincée avec au moins 6 mL de tampon pendant 2 min (temps d'incubation de la solution avec la surface), puis 100 μg de DHFR R67 a été injectée. L'immobilisation de l'enzyme sur la surface a été suivie pendant 20 min d'incubation avant de rincer la surface avec 60 fois le volume du réservoir (6 mL) de tampon afin d'enlever l'excédent d'enzyme.

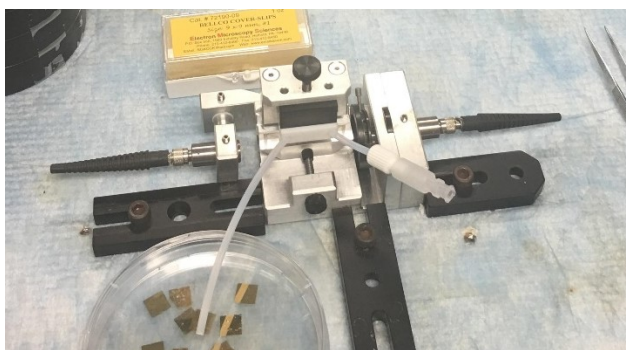


Figure 3-10 Montage utilisé pour la caractérisation d'enzyme immobilisées en surface

Montage utilisé pour l'immobilisation de la DHFR R67 sur des lamelles de 9×9 mm recouvertes d'or afin de vérifier le maintien de l'activité enzymatique après avoir été immobilisée.

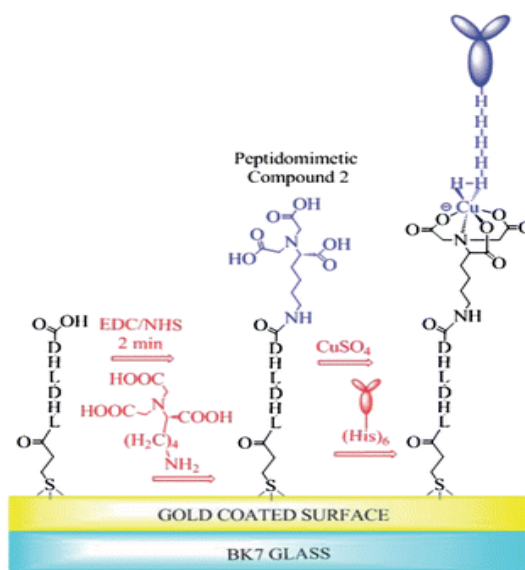


Figure 3-11 Assemblage utilisé pour l'immobilisation de la DHFR R67 à une surface d'or

Schéma représentant la formation de monocouche peptidique utilisée pour la liaison de protéines ayant une queue d'histidines (His-tag) (figure reproduite de [12]).

Le recouvrement de la surface (Γ , ng/cm²) par la His-tag DHFR R67 a été calculé pour le calcul de l'activité spécifique de l'enzyme immobilisée. La valeur de Γ se calcule selon l'équation suivante (Équation 3-1) [13-14] :

$$\Gamma = \rho \times \left(-\frac{l_d}{2}\right) \times \ln\left(1 - \frac{\Delta\lambda}{m \times (n_{SAM} - n_{milieu})}\right)$$

Équation 3-1 Calcul du recouvrement d'une surface en utilisant les signaux SPR

où ρ correspond à la densité moyenne de la monocouche de protéine adsorbée pour les SAM de peptide de type 3-MPA-(aa)_n-OH (1,3 g/cm³)[11], l_d est la distance de pénétration du plasmon (environ 230 nm), $\Delta\lambda$ est le déplacement de la longueur d'onde associé avec immobilisation de la protéine, m est la sensibilité de l'indice de réfraction du senseur SPR (1765 nm/ RIU)[11], n_{SAM} est l'indice de réfraction de la couche auto-assemblée de peptide (1,57 RIU)[11] et n_{milieu} est l'indice de réfraction du tampon (environ 1,33 RIU)[14]. La quantité totale de DHFR R67 immobilisée sur la surface (Q) a été déterminée par $Q = \Gamma S$ [13], où $S = 0,166$ cm² est l'aire de la surface en contact avec la protéine.

Pour vérifier l'activité de la His-tag DHFR R67 immobilisée, les puces recouvertes de l'enzyme ont été placées à la verticale le long de la paroi d'une cuvette de 3 mL de quartz UV-vis ayant un parcours optique de 1 cm [12], afin de laisser le faisceau lumineux atteindre le détecteur. Les puces ont été immergées dans cette cuvette qui contenait une solution de 100 µM de NADPH (cofacteur) et 100 µM de DHF (substrat) dans du tampon KPO₄ 50 mM, pH 7.0, sous une agitation lente. L'activité de l'enzyme immobilisée a été mesurée en triplicata par le changement d'absorbance à 340 nm pendant 30 minutes. Ce signal résulte de l'oxydation du NADPH accompagnée de la réduction du DHF en THF. La vitesse de consommation du NADPH et du DHF a été corrigée par la référence (sans DHFR R67) puis elle a été utilisée pour déterminer l'activité spécifique du biorécepteur immobilisé, connaissant la masse de protéine (Q) immobilisée.

3.2.3. Résultats et discussion

L'activité spécifique de la His-tag DHFR R67 immobilisée déterminée fut de $0,48 \pm 0,3$ U/mg (n=3), ce qui est semblable à la valeur obtenue pour l'enzyme libre en solution de $0,41 \pm 0,02$ U/mg (n=3). La Figure 3-12 illustre une réaction type d'immobilisation, où le $\Delta\lambda_{SPR}$ généré

fut de $9,6 \pm 0,9$ nm ($n=4$), donnant 58 ± 6 ng de DHFR R67 liée. Ainsi, l'enzyme DHFR R67 portant un motif His-tag peut être immobilisée sur ce type de surface d'or fonctionnalisée comme la His-tag hDHFR[2] tout en maintenant son activité enzymatique. Sachant que l'enzyme immobilisée conserve son activité enzymatique, il est possible d'approximer que l'effet du DMSO sur la variation de l'activité de l'enzyme immobilisée sera semblable à celui de l'enzyme en solution (Chapitre 2).

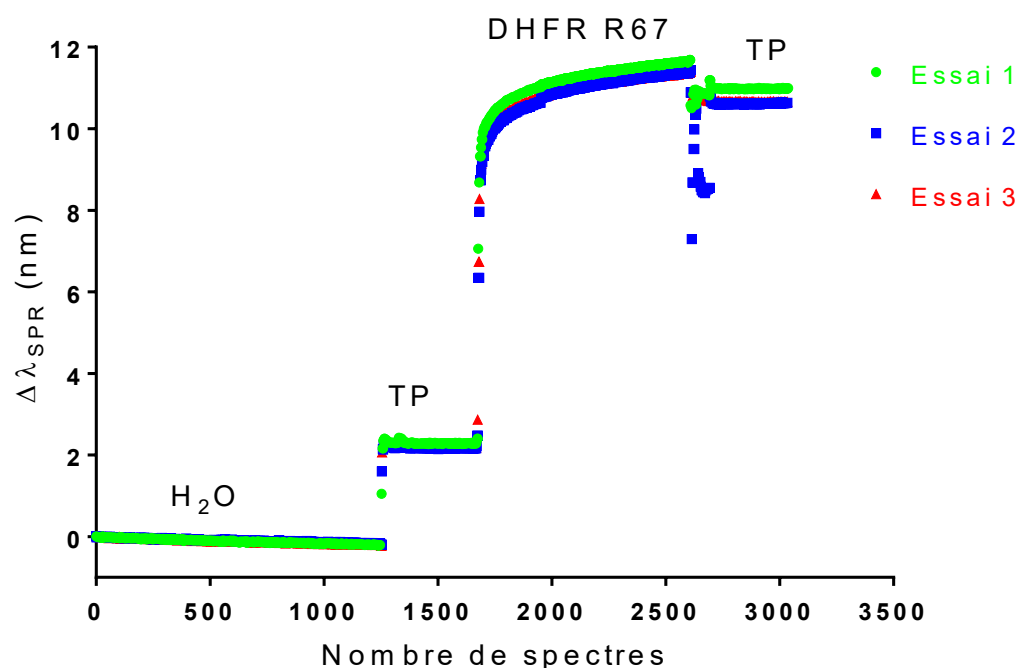


Figure 3-12 Caractérisation de la His-tag DHFR R67 immobilisée pour l'approche A.

Un déplacement λ_{SPR} de $9,6 \pm 0,9$ nm ($n = 4$) est généré lors de l'immobilisation de la His-tag DHFR R67 sur un Cu^{2+} -NTA-LHDLHD-3-MPA@prisme. Définition : TP : tampon KPO_4 50 mM pH=7

Ainsi, ce qu'il manque au développement de la plateforme de criblage selon l'approche A sera de confirmer 1) si la compétition souhaitée (les compétiteurs FA@AuNPs et inhibiteur DHFR34 pour le site actif de la DHFR R67) peut être observée et 2) s'il existe des interactions non-spécifiques importantes entre les compétiteurs en absence de la cible.

La première expérience LSPR effectuée (Figure 3-13) consiste à suivre les changements de λ_{LSPR} générés suite à des événements de liaison à la surface des FA: AuNPs lors d'une compétition suivant l'ajout des différents acteurs, tel que schématisé à la Figure 3-1.

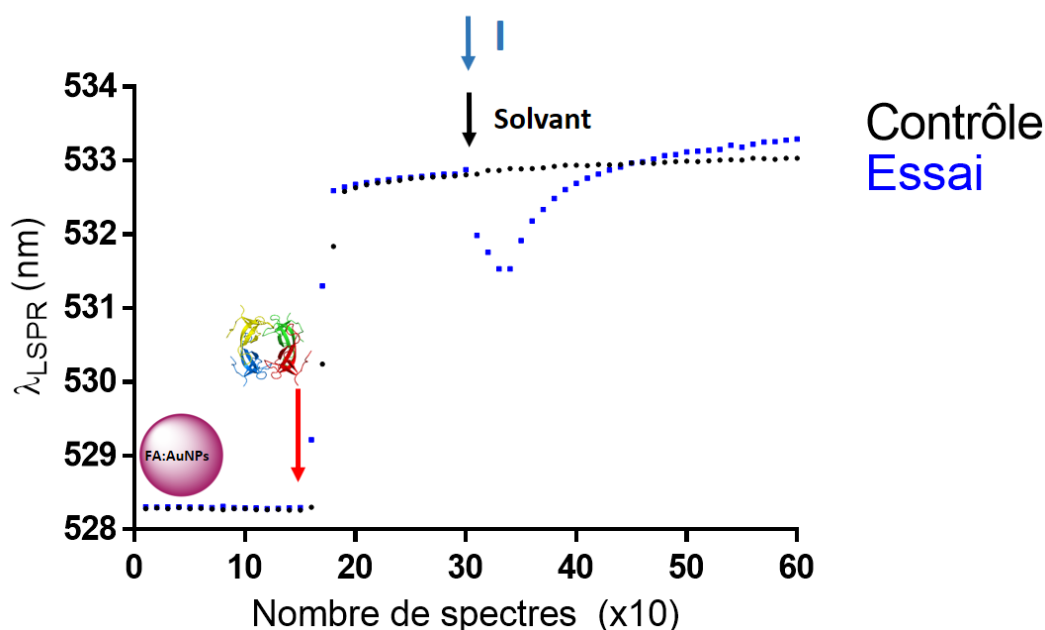


Figure 3-13 Essai compétitif en LSPR pour l'approche A impliquant des FA:AuNPs

Déplacement LSPR bathochromique de 0.5 nM FA:AuNPs dans du tampon KP + 10% DMSO (solvant) par l'ajout de l'enzyme DHFR R67 au 180^e spectre (flèche rouge), suivi d'un ajout de solvant au 300^e spectre (Contrôle, flèche noire), ou de 10% d'inhibiteur DHFR34 600 μ M solubilisé dans 10% DMSO au 300^e spectre (Essai, flèche bleue). Pour l'expérience contrôle, $\Delta\lambda_{LSPR}$ à l'ajout d'enzyme = 4.3 ± 0.2 nm et 0.000 ± 0.005 nm à l'ajout de solvant ($n = 4$). Pour l'essai, $\Delta\lambda_{LSPR}$ à l'ajout d'enzyme = 4.3 ± 0.2 nm et de -2.0 ± 0.8 nm à l'ajout de l'inhibiteur ($n=4$).

La Figure 3-13 illustre un premier déplacement bathochromique de λ_{LSPR} associé à la liaison de l'enzyme aux FA:AuNPs, tel qu'attendu. En effet, l'FA à la surface des AuNPs permet des interactions spécifiques avec le site actif de l'enzyme comparé aux cit:AuNPs. Néanmoins, ces dernières donnent lieu à des interactions non spécifiques significatives (Figure 3-14). Celles-ci peuvent résulter d'interactions électrostatiques des citrates chargés négativement avec les charges positives des acides aminés en surface de la His-tag DHFR R67. Il y aurait lieu de vérifier si ces interactions non spécifiques seraient réduites pour la DHFR R67 sans la queue de polyhistidines qui, à pH 7,0, porterait de façon prépondérante des charges positives.

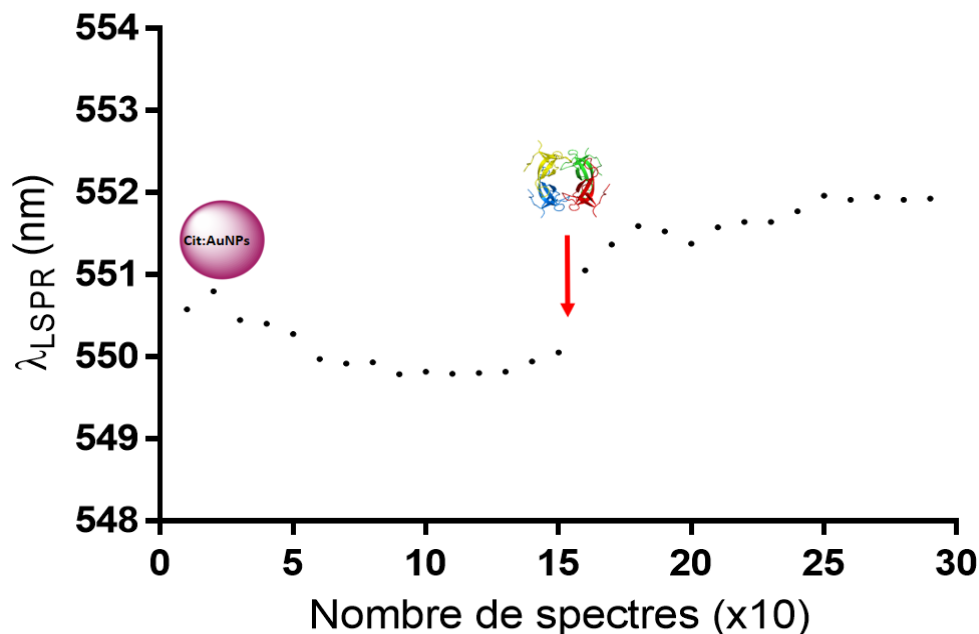


Figure 3-14 Vérification des interactions non-spécifiques entre les cit:AuNPs et la DHFR R67

Variations du signal LSPR des cit:AuNPs 0.4 nM dans du tampon KP suite à l'ajout de 100 nM de l'enzyme DHFR R67, $\Delta\lambda_{LSPR} = 2.3 \pm 0.3$ nm ($n=4$).

Contre toutes attentes, le signal LSPR obtenu à l'ajout de l'inhibiteur *DHFR34* pour la compétition des FA@AuNPs dans le site actif de l'enzyme est un déplacement hypsochromique ($\Delta\lambda < 0$), ce qui est contraire à la tendance LSPR bathochromique prédite à la Figure 3-3 ($\Delta\lambda > 0$). Ce déplacement hypsochromique disparaît avec le temps. Ceci est inattendu puisque les FA:AuNPs, supposément déplacées du site actif de la DHFR R67 par l'ajout de l'inhibiteur, ne devraient pas en principe pouvoir lier à nouveau l'enzyme. Effectivement, l'inhibiteur *DHFR34* a une meilleure affinité pour le site actif de la DHFR R67 avec $K_i = 2,4$ μ M comparativement aux constantes de liaison coopératives de l'FA avec $K_{d1} = 120$ μ M et $K_{d2} = 36$ μ M[15].

Une première hypothèse serait que la concentration élevée de FA à la surface des AuNPs permettrait aux FA:AuNPs de lier à nouveau la DHFR R67, par un effet d'avidité (semblable aux phénomènes observés chez les anticorps[16]). Une expérience contrôle a permis d'écarter cette hypothèse : nous avons également observé un déplacement hypsochromique reproductible de la λ_{LSPR} des FA:AuNPs lors de l'ajout de l'inhibiteur *DHFR34* en absence de l'enzyme DHFR R67(Figure 3-15). Ce phénomène de déplacement hypsochromique se produit spécifiquement à l'ajout de *DHFR34* mais n'a pas été observé à l'ajout du MTX, tel que précédemment publié[2] et reproduit ici (Figure 3-16).

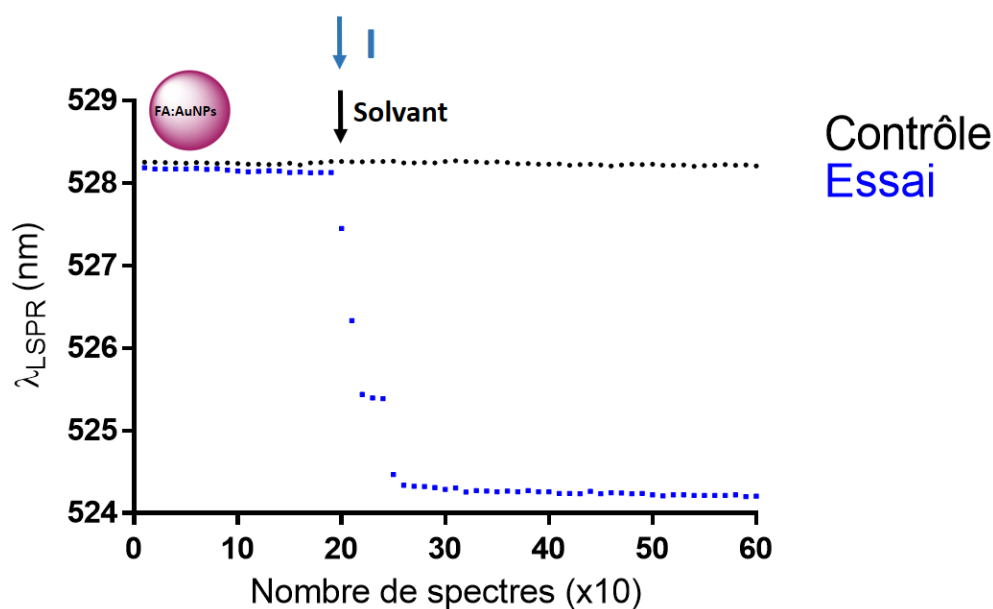


Figure 3-15 Vérification des interactions non-spécifiques entre les FA: AuNPs et l'inhibiteur *DHFR34*

Déplacement LSPR de la FA: AuNPs dans du tampon KP / DMSO à 10% par l'ajout de (a) tampon KP/10% DMSO
Déplacement LSPR de FA: AuNPs en KP / DMSO à 10% (solvant) par l'ajout de (a) solvant au 200^e spectre (Contrôle), ou (b) 10% d'inhibiteur DHFR34 600 μ M en solvant au 200^e spectre (Essai). $\Delta\lambda_{LSPR}$ (Contrôle) = $-0,1 \pm 0,1$ nm et $\Delta\lambda_{LSPR}$ (Essai) = $-3,8 \pm 0,3$ nm ($n = 4$).

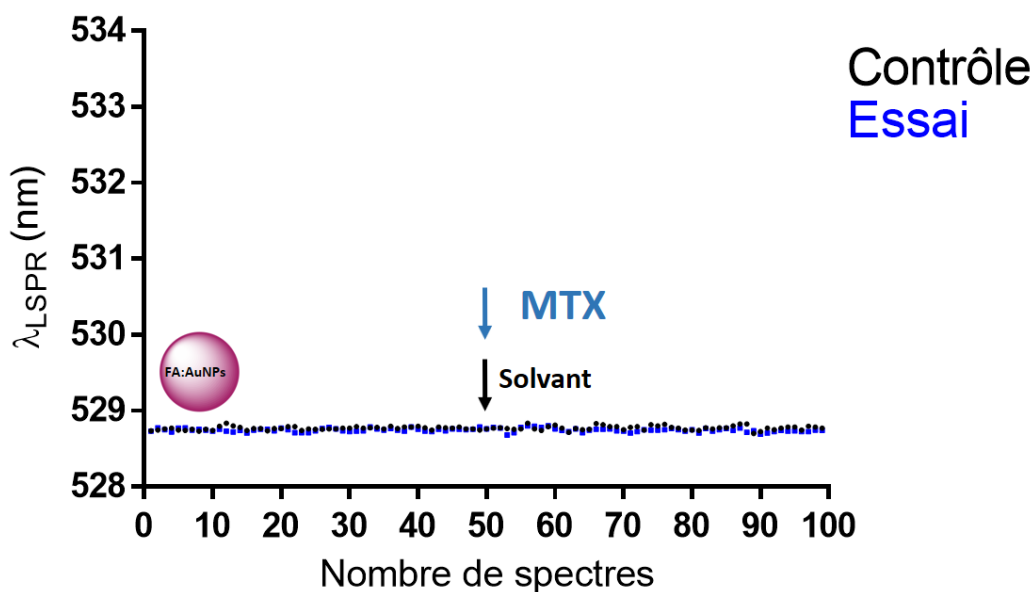


Figure 3-16 Vérification des interactions non-spécifiques entre les FA: AuNPs et l'inhibiteur MTX

Déplacement de LSPR de 0,25 nM FA: AuNPs en KP 50 mM pH = 7 (solvant) par addition de (a) 100 μ L de solvant au 50^e spectre (Contrôle), ou (b) 100 μ L de MTX 1 μ M en solvant au 50^e spectre (Essai). Aucun $\Delta\lambda_{LSPR}$ n'est observé ($n = 3$).

Ainsi, le déplacement hypsochromique observé en présence de DHFR R67 (Figure 3-13) n'est peut-être pas dû à une compétition FA:AuNPs vs l'inhibiteur pour le site actif de l'enzyme (phénomène désiré), mais au déplacement des FA. Puis, l'FA pourrait être partiellement remplacé par l'inhibiteur à la surface des AuNPs. Il pourrait en suivre une liaison des FA:I:AuNPs à l'enzyme, donnant lieu à un déplacement bathochromique. Cette hypothèse expliquerait pourquoi l'on observe un retour du signal à la ligne de base suite au déplacement hypsochromique. Cette hypothèse est illustrée à la Figure 3-17.

Enfin, ces expériences ont révélé un problème important qui aurait été rencontré et donc, passé comme inaperçu lors du criblage sur la plateforme finale SPR développée. En effet, étant donné que l'essai de criblage est basé sur les FA:AuNPs en tant que sondes en compétition avec les composés à cribler, maintenir l'intégrité des FA:AuNPs lors de l'ajout des inhibiteurs est absolument essentiel pour le succès du test de criblage développé. Par conséquent, des efforts ont été investis pour comprendre et résoudre le problème observé à la Figure 3-15.

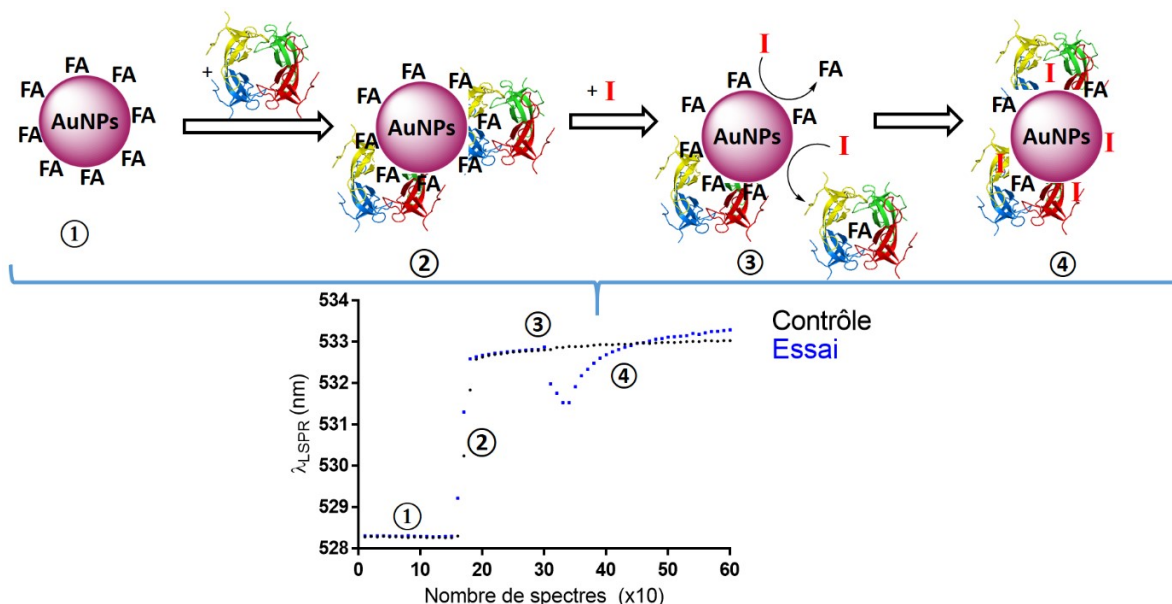


Figure 3-17 Mécanisme proposé pour expliquer les signaux LSPR observés pendant l'essai compétitif selon l'approche A

Lors de l'ajout de la cible DHFR R67 dans une solution de FA@AuNPs (étape 1), la liaison entre les FA@AuNPs et la DHFR R67 génère un déplacement bathochromique de λ_{LSPR} (étape 2). L'ajout d'un excès d'inhibiteur (Essai, courbe bleue) avec une affinité plus élevée que l'FA produirait la dissociation partielle entre les FA@AuNPs et la DHFR et la substitution d'FA à la surface des AuNPs via un mécanisme d'échange de ligands. Cela génère un déplacement hypsochromique de λ_{LSPR} pour le déplacement du DHFR R67, d'amplitude plus faible que le déplacement bathochromique précédent (étape 3). Les FA/I@AuNPs lient la DHFR R67 déplacée à l'étape 3, donnant un déplacement bathochromique ayant l'allure d'une courbe de liaison (étape 4) ($n = 4$). Contrôle (noir) : ajout de solvant à l'étape 3 au lieu de l'inhibiteur.

Chapitre 3 : Développement d'une plateforme de criblage

L'hypothèse proposée à la Figure 3-17 a été explorée en plus de profondeur à l'aide de mesures de spectres d'absorbance afin de vérifier si l'inhibiteur *DHFR34* (I_{34}) est en mesure de déplacer les FA liés de façon non-covalente à la surface des AuNPs. Cette vérification se faisait en mesurant le spectre d'absorbance d'échantillons de cit@AuNPs ayant été fonctionnalisées avec I_{34} , avec l'FA ou avec un mélange équimolaire des deux. La Figure 3-18 montre que le $\Delta\lambda_{SPR}$ associé à la formation de FA/ I_{34} @AuNPs est le double du $\Delta\lambda_{SPR}$ pour les FA@AuNPs. La formation de I_{34} @AuNPs résulte en des particules instables (agrégation observée), conformément au $\Delta\lambda_{SPR}$ de 151 nm observé. Ces résultats suggèrent qu'il est possible qu'il y ait un remplacement partiel de FA par I_{34} à la surface des FA:AuNPs par l'inhibiteur. Tout comme FA, I_{34} possède des groupements carboxylate pouvant interagir avec la surface réduite des AuNPs, permettant l'échange de ligands. Bien que cela puisse expliquer en partie l'observation du déplacement hypsochromique de λ_{SPR} observé (Figure 3-15), cela n'est pas cohérent avec le fait que le MTX possède également des groupement carboxylate mais ne déplace pas FA.

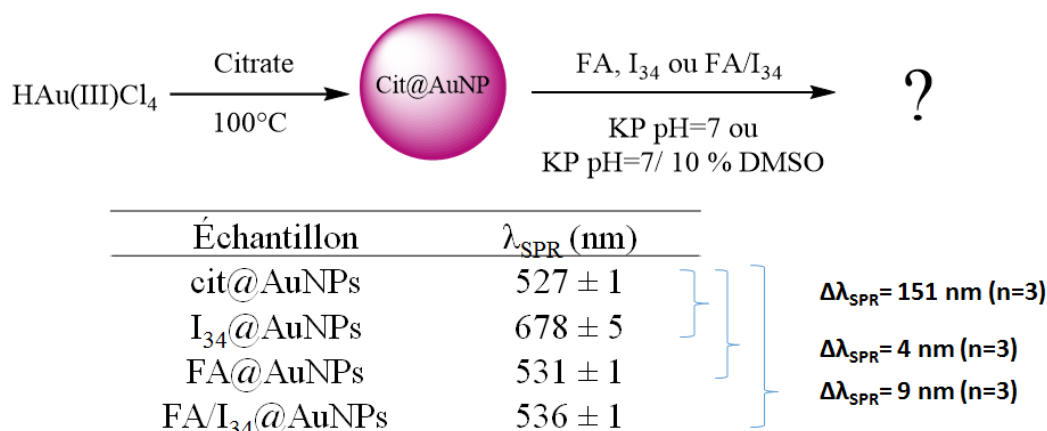


Figure 3-18 Vérification de la possibilité de fonctionnalisation des cit@AuNPs par l'inhibiteur DHFR34 (I_{34})
 Mesure de λ_{SPR} de différentes cit@AuNPs ayant été fonctionnalisées de façon non-covalente par I_{34} , FA ou un mélange équimolaire de FA/ I_{34} .

Afin de contourner ces signaux LSPR relativement complexes à interpréter dans le contexte d'un développement d'une plateforme de criblage utilisant des FA@AuNPs, une fonctionnalisation covalente des AuNPs à l'FA fut considérée dans l'optique de pouvoir éliminer les interactions non spécifiques entre les deux compétiteurs de l'approche A, soit les FA:AuNPs et l'inhibiteur. Cette fonctionnalisation covalente vise à stabiliser davantage la structure des FA@AuNPs synthétisées dans l'espoir d'atténuer ou d'éliminer complètement les interactions non spécifiques avec l'inhibiteur *DHFR34*.

3.2.3.1. Fonctionnalisation covalente des FA-AuNPs

La fonctionnalisation covalente des AuNPs à l'FA fut tentée en couplant un des deux carboxylates de l'FA et divers espaceurs moléculaires ayant une amine primaire (Figure 3-19). Toutes les tentatives de fonctionnalisation covalentes d'AuNPs avec FA sont résumées à la Figure 3-20.

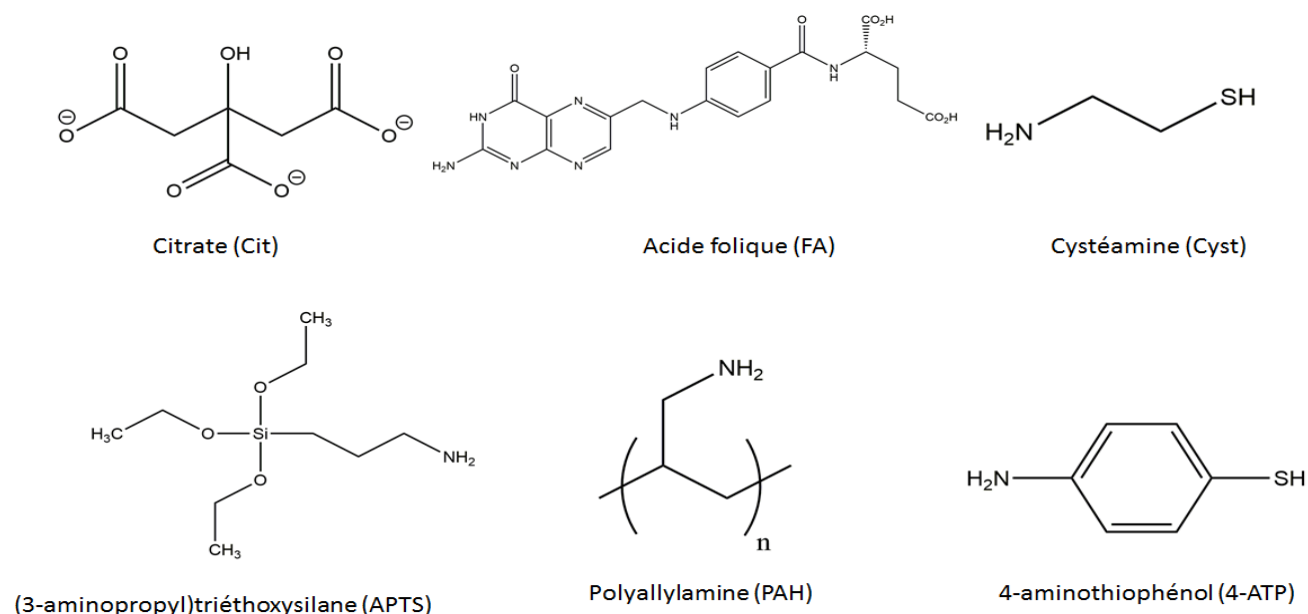


Figure 3-19 Amines primaires utilisées pour fonctionnaliser la surface des AuNPs

La réaction 1, inspirée d'un protocole publié [17], consistait à créer des FA-AuNPs en passant par trois couches de revêtement. Bien que cette synthèse implique particulièrement plusieurs étapes de réaction, elle fut choisie afin d'obtenir des AuNPs avec un revêtement de molécules connues, plus particulièrement la silice, permettant des répulsions entre les NPs[17]. Ces répulsions évitent l'agrégation des NPs, augmentant ainsi la stabilité de celles-ci en milieu aqueux. La synthèse consistait à faire une réaction d'échange des citrates par des groupements de triéthoxysilane (TEOS) afin de faire une première couche d'oxyde de silice SiO_2 . Le (3-aminopropyl)triéthoxysilane (APTS) est ensuite utilisé pour lier à la silice afin de former une seconde couche SAM portant des amines primaires terminaux. Plus précisément, il y a d'abord une hydrolyse des groupements alcoxyles ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{O}-$) comme première étape suivit par une adsorption covalente du produit hydroxysilane résultant à la surface du SiO_2 . Ainsi, il y a formation de liens covalents Si-O-Si ce qui résulte en une couche d'aminopropylsilane

(APS)[18]. Ces amines primaires servent ensuite dans un couplage EDC/NHS avec les groupements acides carboxyliques de l'FA pour obtenir des FA-APS-SiO₂-AuNPs.

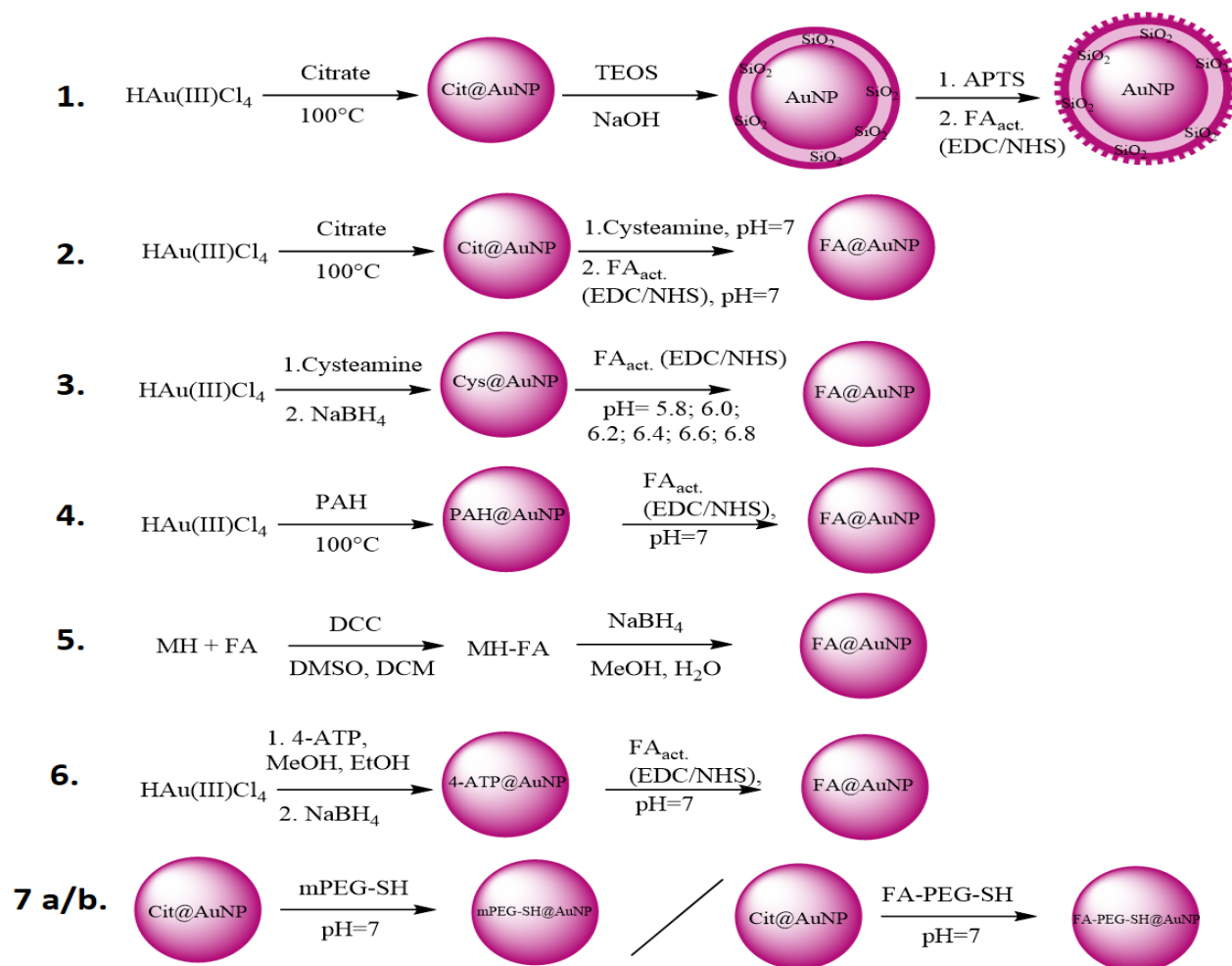


Figure 3-20 Réactions testées pour la fonctionnalisation covalente des AuNPs avec l'FA

La réaction 7a fut testée comme NPs de référence pour les cinétiques LSPR utilisant les NPs obtenues par la réaction 7b. Définitions: TEOS: triéthoxyéthylsilane, APTS: (3-aminopropyl)triéthoxysilane, NaBH₄: borohydrure de sodium, PAH: polyallylamine, MH: mercaptohexanol, DCC: N,N'-dicyclohexylcarbodiimide, DCM: dichlorométhane, 4-ATP: 4-aminothiophénol, FA-PEG-SH: acide folique poly(éthylène)glycol thiol, mPEG-SH: méthoxy poly(éthylène)glycol thiol.

Il faut noter qu'en terme de réactivité, le groupement γ -COOH de l'FA est plus susceptible d'être couplé au EDC comparativement au groupement α -COOH (Figure 1-2). En effet, deux études [19-20] suggèrent que cette préférence vient du fait que la réaction favorise le carboxylate le plus basique (pKa de 4.5 pour γ -COOH ; pKa de 2.5 pour α -COOH). De plus, bien que les deux -COOH soient impliqués dans des interactions ioniques avec les résidus Lys32 de la DHFR R67 (voir introduction), la conjugaison d'un des -COOH de l'FA ne devrait pas

empêcher la reconnaissance de l'FA par l'enzyme, puisque les -COOH ne servent qu'à diminuer les mouvements de la queue glutamate de l'FA afin de favoriser une liaison plus serrée entre l'FA et la DHFR R67 [21].

Enfin, cette synthèse a donné lieu à des NPs non agrégées au cours de toutes les étapes de modification. Cependant, la bande plasmonique obtenue à la fin de la synthèse n'était pas suffisamment définie (spectre d'absorbance évasé, non montré) pour vérifier les interactions avec l'inhibiteur sélectionné.

La réaction 2 a mis en jeu un couplage EDC/NHS entre les amines primaires de la cystéamine et les groupements acides carboxyliques de l'FA. Cette réaction fut choisie puisqu'elle implique moins d'étapes de préparation et de lavage que la réaction 1. L'agrégation des NPs a été observée lors de l'échange du citrate avec la cystéamine. Il est plausible qu'une attraction électrostatique entre les amines de la cystéamine et les acides carboxyliques des citrates entre des NPs adjacentes lors de l'échange de ligand ait formé des réseaux de NPs floculées[22].

Pour pallier à ce problème, une voie de synthèse des cyst@AuNPs plus directe et sans l'utilisation de cit:AuNPs fut tentée[23]. Dans la réaction 3, la cystéamine est d'abord ajoutée au précurseur de nanoparticules HAu(III)Cl_4 pour former un polymère de Au (I)-thiolate (la solution est devenue orange). L'agent réducteur NaBH_4 est ajouté afin de réduire Au (I) à Au (0) et ainsi, initier la nucléation puis l'agrégation pour induire la formation des cyst@AuNPs. La synthèse fut réussie: les cyst@AuNPs obtenues étaient stables dans l'eau et présentaient une bande plasmonique bien définie (un seul pic, spectre non montré). De plus, la même synthèse réalisée sans cystéamine comme contrôle (AuNPs) donnait également des NPs avec une bande plasmonique bien définie, ce qui confirmait que les cyst@AuNPs obtenues étaient aussi stables et sphériques que les AuNPs. Cependant, lors de la tentative de conjugaison covalente des cyst@AuNPs avec l'FA à différents pH, l'agrégation des NPs a été observée avec une bande plasmonique évasée (pic très large et non défini), et ce à tous les pH testés. La variation du pH visait à identifier une condition dans laquelle une légère proportion d'amines serait protonée pour promouvoir la répulsion entre les nanoparticules. Ceci devrait prévenir l'agrégation tout en conservant une majeure partie des amines sous la forme neutre, nucléophile, pour le couplage

EDC/NHS avec le carboxylate de l'FA. Le pKa de l'amine de la cystéamine est de 10.75[24]. Toutefois, faire varier le pH du milieu n'a pas pu promouvoir la stabilité des FA-Cyst@AuNPs.

Lors de la réaction 4, les AuNPs ont été synthétisées en présence de polyallylamine (PAH) en tant qu'agent réducteur[25], générant en une seule étape des AuNPs avec des groupements amines primaires terminaux hautement hydrosolubles et avec une bande plasmonique bien définie (un seul pic, spectre non montré). Cependant, après avoir traités les PAH@AuNPs avec l'FA activée à l'EDC/NHS, la précipitation des NPs a été observée. Par conséquent, l'utilisation de FA-PAH@AuNPs a été écartée comme solution pour stabiliser les FA@AuNPs.

La réaction 5, selon une modification du protocole rapporté dans la référence [26], comportait une estérification de Steglich. Celle-ci a échoué puisqu'aucune précipitation du produit de conjugaison entre le groupement hydroxyle du mercaptohexanol (MH) et le carboxylate de l'FA ne fut observé. Une approche alternative à cette réaction serait d'utiliser du 4-(diméthylamino)pyridine (DMAP) avec le MH pour catalyser le couplage[27]. Puisque la répétition de la synthèse avec le DMAP impliquerait plusieurs étapes additionnelles de réactions et de caractérisations qui ne simplifierait pas la méthode de synthèse de FA@AuNPs, cette voie de synthèse ne fut pas explorée davantage.

L'échange de ligands entre les cit:AuNPs et 4-aminothiophénol (4-ATP) fut tenté lors de la réaction 6, toujours dans le but d'obtenir des amines primaires à la surface des AuNPs pour le couplage EDC/NHS avec l'FA (voir la réaction 3). Les NPs obtenus suite à la 1^{ère} étape de la synthèse étaient hautement hydrosolubles et avec une bande plasmonique bien défini (un seul pic, non montré). Suite au couplage avec l'FA, NPs obtenues furent utilisées en LSPR pour reproduire les expériences illustrées aux Figure 3-13 et Figure 3-15. Cependant, aucun signal pour la liaison de l'enzyme aux NPs ne fut observé, suggérant que l'FA n'a pas été couplé avec succès. De ce fait, une caractérisation par spectrométrie infrarouge à transformation de Fourier (FTIR) a été faite dans le but de confirmer l'obtention de NPs de type (4-ATP)@AuNPs. Les résultats en FTIR démontrent que les bandes caractéristiques de l'amine des (4-ATP)@AuNPs attendues à 3440 et 3325 cm^{-1} [28] étaient manquantes, contrairement à celles de du 4-ATP libre; les amines sont essentielles au couplage EDC/NHS avec l'FA(Figure 3-21). De plus, la bande à 2560 cm^{-1} , caractéristique du thiol, était présente chez le 4-ATP [28]. Ainsi, cela suggère que

la structure chimique du précurseur (4-ATP) avait les deux groupements réactifs -SH et -NH₂ désirés, mais que suite au couplage avec les AuNPs, il y aurait eu non seulement une perte du groupement -SH pour la formation d'un lien Au-S, mais possiblement une réaction secondaire impliquant les groupes -NH₂. En effet, il est bien connu dans la littérature que les amines comme les thiols ont également une forte affinité pour l'or [29-31]. Ainsi, il n'y aurait possiblement pas eu de groupements -NH₂ disponibles à la surface des AuNPs pour être couplés avec l'FA.

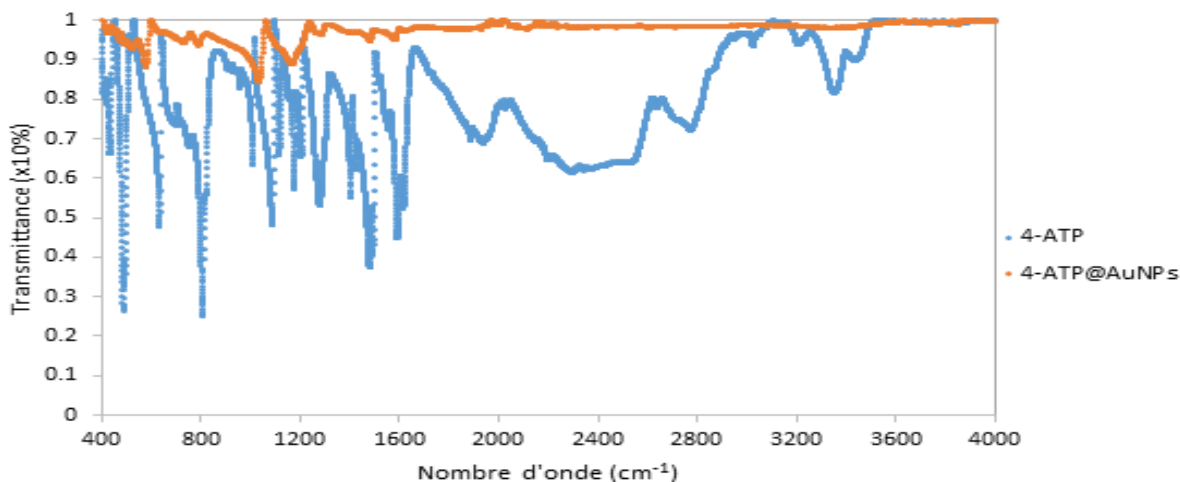


Figure 3-21 Spectres infrarouges (FTIR) superposés entre le 4-ATP et les 4-ATP@AuNPs

Les spectres infrarouges ont été mesurés avec une résolution de 1 cm⁻¹ avec une acquisition totale de 50 spectres pour faire la mesure de la référence (blanc) ainsi que celle de l'échantillon.

Étant donné l'incertitude concernant l'obtention de FA-(4TP)@AuNPs par la voie de synthèse 6, une approche plus directe de fonctionnalisation covalente des AuNPs par l'FA en une seule étape fut tentée à la réaction 7. Les liaisons covalentes de type Au-S donnent des AuNPs résultantes plus stables dans un milieu à haute force ionique tel le tampon KPO₄ comparativement à des liaisons non covalentes comme pour les cit:AuNPs. En effet, un tampon à haute force ionique favorise la précipitation des cit:AuNPs[32] puisque qu'il s'y produit un masquage des charges de citrates permettant la répulsion entre les cit:AuNPs. Ce phénomène se nomme «*salt-induced aggregation*», un phénomène très bien connu pour les suspensions de NPs métalliques[32]. Les FA-PEG-SH@AuNPs fonctionnalisées de manière covalente à partir de cit:AuNPs obtenues étaient hautement hydrosolubles, avec une bande plasmonique bien définie (un seul pic, spectre non montré) et ce, en une seule étape *via* un mécanisme d'échange de ligand. Ainsi, le succès de la fonctionnalisation fut suggéré par le déplacement bathochromique de la bande plasmonique (λ_{max}) des cit:AuNPs ainsi que l'observation de la stabilité des FA-

PEG-SH@AuNPs une fois solubilisée dans le tampon KPO₄ (où une précipitation est normalement observée pour les cit:AuNPs).

Pour vérifier les interactions spécifiques dues à la présence de l'FA à la surface des AuNPs, les FA-PEG-SH@AuNPs ainsi que leurs nanoparticules de contrôle (mPEG-SH@AuNPs) ont été ensuite utilisées en LSPR pour reproduire les expériences illustrées aux Figure 3-13 et Figure 3-15.

La fonctionnalisation des AuNPs par l'FA *via* l'utilisation de FA-PEG-SH a réduit de manière significative les interactions non-spécifiques entre les FA-AuNPs et l'inhibiteur *DHFR34* comparé à celles fonctionnalisées de façon non-covalente (Figure 3-22, $\lambda_{LSPR} \sim 0,6$ nm; comparer à la Figure 3-15, $\lambda_{LSPR} \sim 4$ nm).

Les FA-PEG-SH@AuNPs furent testées dans une compétition avec l'inhibiteur pour le site actif de l'enzyme (Figure 3-23). Aucun déplacement bathochromique correspondant à une liaison de l'enzyme ne fut observé. De plus, un déplacement hypsochromique fut observé à la suite de l'ajout d'inhibiteur. Il est intéressant de souligner que ce déplacement hypsochromique est semblable à celui observé à la Figure 3-13 lorsque des FA:AuNPs avaient été utilisées.

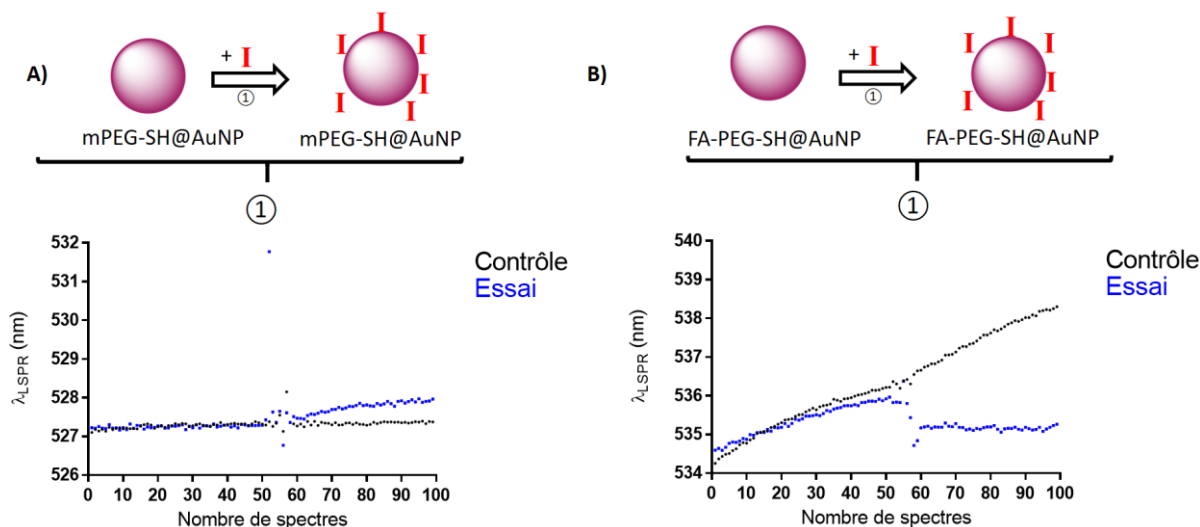


Figure 3-22 Vérification des interactions non-spécifiques entre les FA-AuNPs et l'inhibiteur *DHFR34*
Cinétiques LSPR impliquant 0.50 nM de (A) *mPEG-SH@AuNPs* ou (B) *FA-PEG-SH@AuNPs* en KP 50 mM pH 7 + 10%DMSO (solvant), suivi de ① l'ajout de 6 μ L de *DHFR* R67 17 μ M au 50^e spectre, suivi de ② soit 100 μ L de de solvant (Contrôle) ou de 100 μ L 600 μ M Inhibiteur *DHFR34* en solvant (Essai) au 100^e spectre. . (A) $\Delta\lambda_{LSPR}$ (Contrôle, 1) = 0.6 ± 0.1 nm, $\Delta\lambda_{LSPR}$ (Contrôle, 2) = 0.1 ± 0.3 nm et $\Delta\lambda_{LSPR}$ (Essai, 1) = 0.7 ± 0.1 nm, $\Delta\lambda_{LSPR}$ (Essai, 2) = -3.6 ± 0.6 nm. (B): $\Delta\lambda_{LSPR}$ (Contrôle, 1) = 0.6 ± 0.1 nm, $\Delta\lambda_{LSPR}$ (Contrôle, 2) = 0.1 ± 0.3 nm et $\Delta\lambda_{LSPR}$ (Essai, 1) = 0.7 ± 0.1 nm, $\Delta\lambda_{LSPR}$ (Essai, 2) = -3.6 ± 0.6 nm; (n=3).

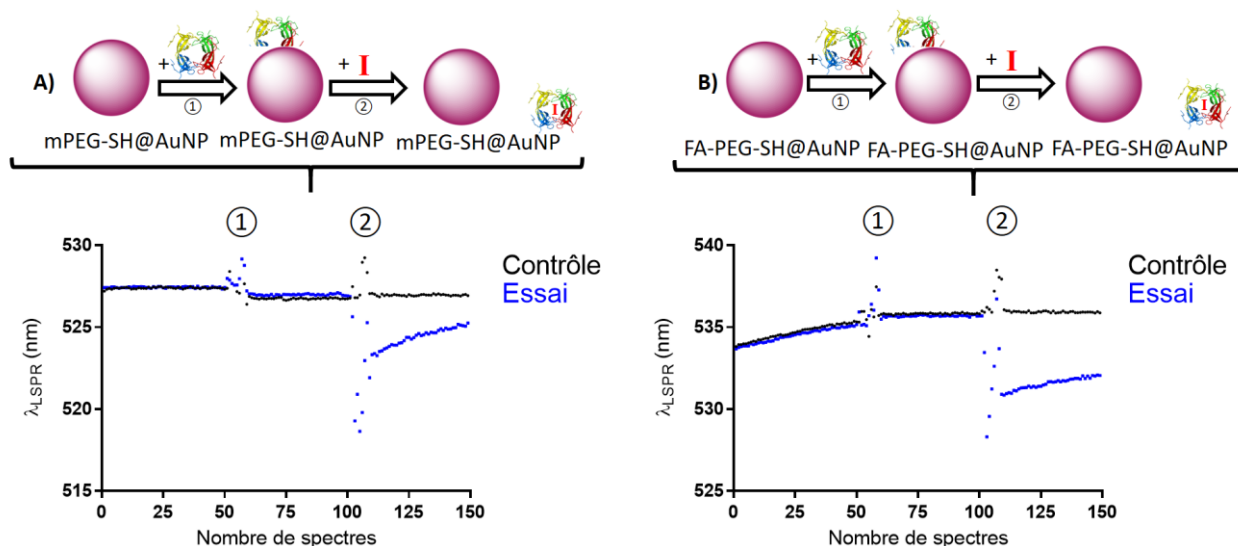


Figure 3-23 Essai compétitif en LSPR pour l'approche A impliquant des FA-AuNPs

Cinétiques LSPR impliquant 0.50 nM de (A) **mPEG-SH@AuNPs**/10%DMSO&KP 50 mM, pH=7 ou (B) **FA-PEG-SH@AuNPs**/10%DMSO&KP 50 mM, pH=7 suivi d'un ajout de 6 μ L de DHFR R67 17 μ M au 50^e spectre (①), suivi d'un ajout de soit 100 μ L de 10%DMSO&KP 50 mM, pH=7(contrôle) ou de 100 μ L 600 μ M Inhibiteur DHFR34/10%DMSO&KP 50 mM, pH=7 (essai) au 100^e spectre (②). Pour (A), les résultats sont les suivants: $\Delta\lambda_{LSPR}(\text{contrôle}, 1) = 0.6 \pm 0.1 \text{ nm}$ ($n=3$), $\Delta\lambda_{LSPR}(\text{contrôle}, 2) = 0.1 \pm 0.3 \text{ nm}$ ($n=3$) and $\Delta\lambda_{LSPR}(\text{essai}, 1) = 0.7 \pm 0.1 \text{ nm}$ ($n=3$), $\Delta\lambda_{LSPR}(\text{essai}, 2) = -3.6 \pm 0.6 \text{ nm}$ ($n=3$). Pour (B), les résultats sont les suivants: $\Delta\lambda_{LSPR}(\text{contrôle}, 1) = 0.6 \pm 0.1 \text{ nm}$ ($n=3$), $\Delta\lambda_{LSPR}(\text{contrôle}, 2) = 0.1 \pm 0.3 \text{ nm}$ ($n=3$) and $\Delta\lambda_{LSPR}(\text{essai}, 1) = 0.7 \pm 0.1 \text{ nm}$ ($n=3$), $\Delta\lambda_{LSPR}(\text{essai}, 2) = -3.6 \pm 0.6 \text{ nm}$ ($n=3$)

Il est intéressant de noter que le déplacement hypsochromique de $\sim 3.6 \text{ nm}$ observé lors de l'ajout de l'inhibiteur (à l'étape ②, Figure 3-23B) en présence de l'enzyme (ajoutée à l'étape ①) est beaucoup plus important que le déplacement hypsochromique de $\sim 0.6 \text{ nm}$ induit lors de l'ajout de l'inhibiteur en absence de l'enzyme (Figure 3-22B). Ainsi, bien qu'il ne soit pas possible d'observer au préalable un déplacement bathochromique associé à une liaison de l'enzyme aux FA-AuNPs aux étapes ① de la Figure 3-23A et B, il semble que le déplacement hypsochromique des FA-AuNPs qui suit aux étapes ② nécessite la présence de l'enzyme dans le milieu.

De plus, à la Figure 3-23B, la variation de λ_{LSPR} a l'allure d'une courbe de liaison suite à l'ajout de l'inhibiteur. Il se pourrait que les FA-AuNPs (covalentes) nécessitent la présence de l'inhibiteur pour lier la DHFR R67, contrairement aux FA:AuNPs (non-covalentes). Le couplage covalent de l'FA aux AuNPs pourrait favoriser une plus grande quantité de FA par AuNP, générant plus d'encombrement stérique. Cela diminuerait leur capacité de lier l'enzyme. Ainsi, comme dans le cas du substrat DHF comparativement au co-facteur NADPH, il se

pourrait que le K_d des FA-AuNPs soit plus élevé que celui de l'inhibiteur, et donc que le complexe $E \cdot (FA-AuNPs)$ soit défavorisé au détriment du complexe $E \cdot I_{34}$. Une fois le complexe $E \cdot I_{34}$ formé, le K_d des FA-AuNPs pourrait être réduit, favorisant la formation du complexe $E \cdot I_{34} \cdot (FA-AuNPs)$ au détriment des complexes $E \cdot (I_{34})_2$ ou $E \cdot (FA-AuNPs)_2$. Cette hypothèse resterait en accord avec le fait que la DHFR R67 implique intrinsèquement une coopérativité de liaison positive ($K_{d2} < K_{d1}$) quand il s'agit de l'FA.

Ainsi, la complexité des résultats obtenus pourrait s'expliquer par la complexité du mécanisme de liaison entre l'enzyme cible étudiée et les molécules utilisées (FA-AuNPs et I_{34}).

3.2.4. Conclusion

Pour l'approche A, différentes analyses LSPR ont été faites afin d'identifier les interactions potentielles entre les deux compétiteurs de l'essai de criblage, soit les FA@AuNPs et l'inhibiteur *DHFR34*, une analyse qu'il ne serait pas possible d'effectuer en SPR. Lors de l'utilisation des AuNPs fonctionnalisées de manière non-covalente à l'FA (FA:AuNPs) en LSPR, les résultats ont montré l'existence d'interactions entre ces dernières et l'inhibiteur. Afin de contourner ces interactions non désirées, plusieurs méthodes de fonctionnalisation covalente de l'AuNP par l'FA furent tentées. Les AuNPs fonctionnalisées de manière covalente avec l'FA *via* un polymère thiolé (FA-PEG-SH) furent obtenues. Toutefois, cela ne fut pas suffisant pour éviter les interactions non-spécifiques entre ces FA-AuNPs et la *DHFR34*. Ces interactions présentent donc un frein au développement d'une plateforme de criblage basée sur un signal SPR généré exclusivement par une compétition des interactions $FA@AuNP_{(libre)}/Enzyme_{(immobilisée)}$ et $Inhibiteur_{(libre)}/Enzyme_{(immobilisée)}$. Il convient donc d'envisager une seconde approche omettant l'utilisation des FA@AuNPs, en utilisant directement l'enzyme comme amplificateur de signal SPR (rôle que jouaient les FA@AuNPs dans l'approche A). La section suivante décrit une approche alternative.

3.3. Approche B : Essai compétitif impliquant l'FA immobilisé et la DHFR R67

3.3.1. Concept, avantages et inconvénients

Une deuxième approche pour l'essai compétitif en SPR (approche B, Figure 3-24) a été tentée afin de contourner les difficultés rencontrées découlant de l'utilisation d'AuNPs fonctionnalisées dans l'Approche A. Dans l'approche B, l'enzyme DHFR R67 (masse molaire > 1000 Da) est utilisée pour générer un changement de masse significatif à la surface du prisme d'or lors d'une compétition entre l'inhibiteur libre en solution (compétiteur 1) et l'FA immobilisé à la surface du prisme (compétiteur 2).

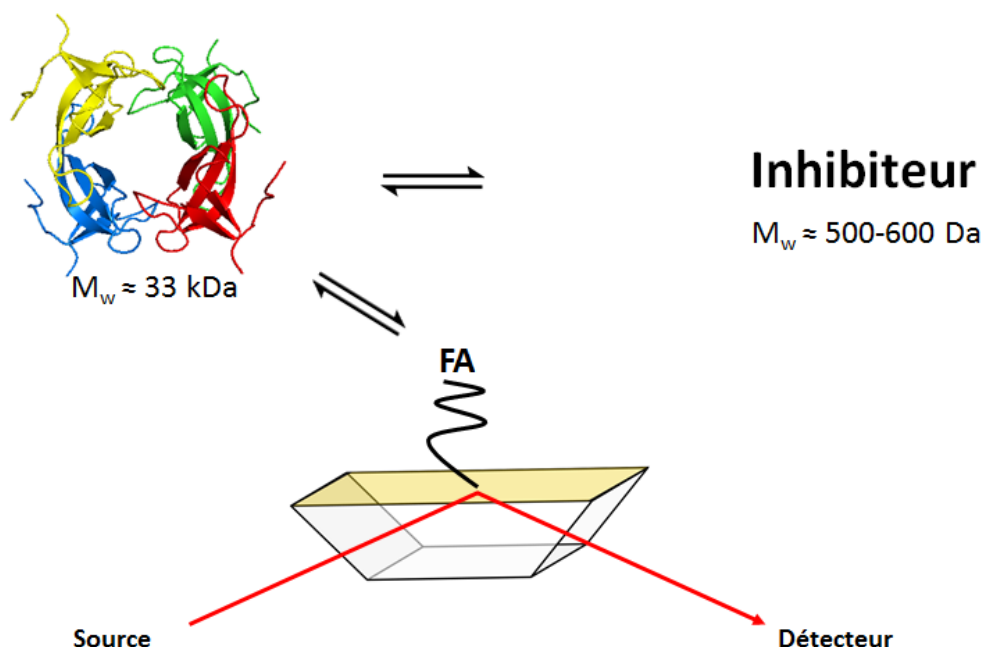


Figure 3-24 Deuxième approche (approche B) pour le développement d'un essai de criblage indirect en SPR
 Dans la deuxième approche, l'FA immobilisé est en compétition avec les composés criblés pour le site actif de la DHFR R67 libre en solution. Cette approche permet de contourner l'utilisation de AuNPs.

La Figure 3-25 présente le signal attendu en SPR pour un essai de criblage compétitif ayant la configuration de l'approche B. L'avantage majeur de cette approche est qu'il y a désormais un acteur en moins (AuNPs fonctionnalisés), ce qui simplifie la méthode.

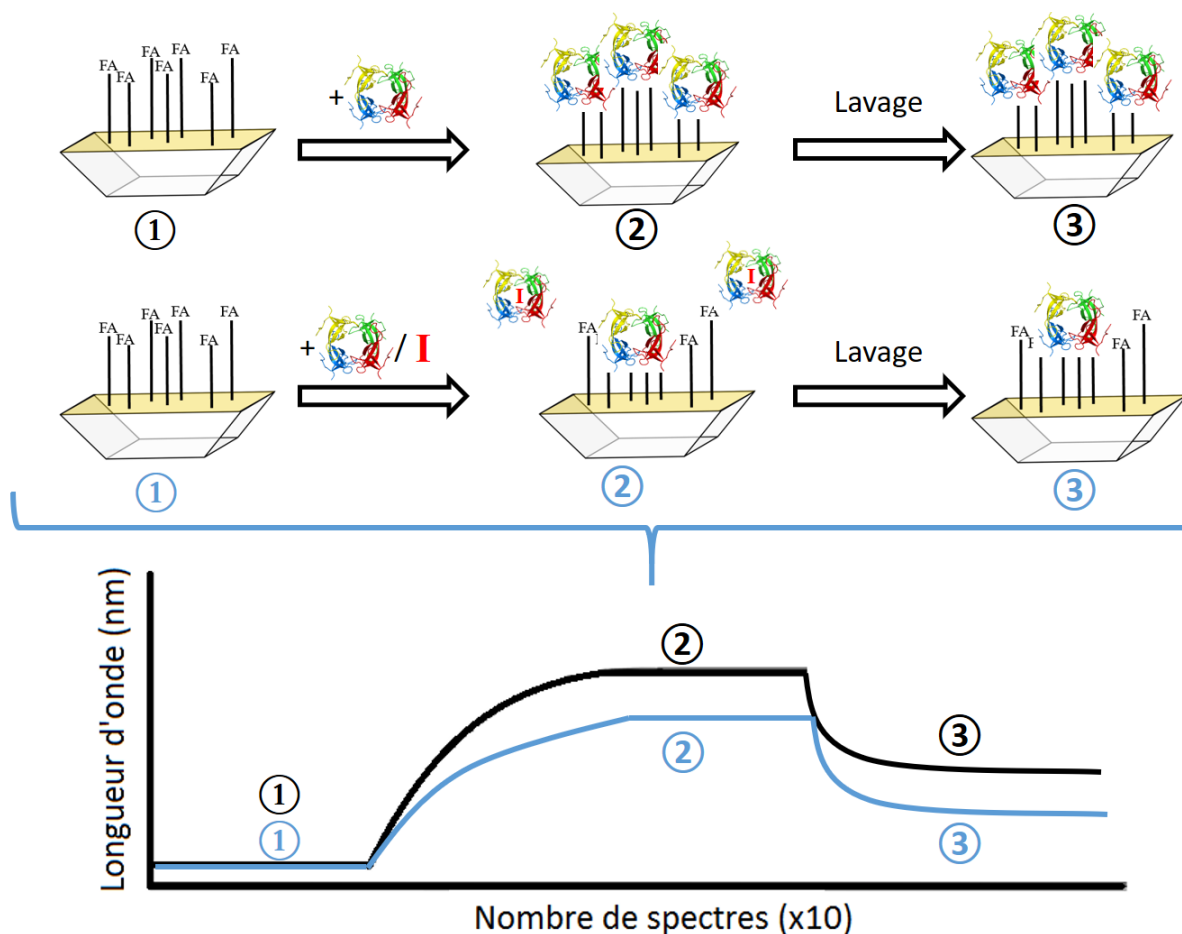


Figure 3-25 Résultats attendus pour l'approche B

Mécanisme proposé pour l'approche B (panneau du haut) avec les déplacements SPR attendus, générés par l'ajout d'enzyme libre (référence, en noir) comparé au déplacement SPR généré par l'ajout d'un mélange d'enzyme et de FA ou inhibiteurs (essai, en bleu) (panneau du bas). Si l'FA ou un inhibiteur lie la DHFR R67, moins de DHFR R67 demeurera disponible pour lier la FA immobilisée à la surface du prisme revêtu d'or, ce qui produira un déplacement SPR plus faible que la référence.

Cependant, il existe des inconvénients à l'approche B. Premièrement, la DHFR R67 libre génère un changement de masse plus faible à la surface d'or que les FA@AuNPs utilisés dans l'approche A. En effet, les AuNP libres de 15 nm ont une masse d'environ 20 MDa [33], soit 10^6 fois supérieure à celle des molécules à cribler (<1000 Da), alors que la DHFR R67 libre (33kDa) n'est que 55 fois plus lourde que ces molécules. Puisque le signal SPR est influencée par la masse se déposant à la surface d'or[34], l'approche B est potentiellement 600 fois moins sensible que l'approche A.

Deuxièmement, il faut procéder à une optimisation de la chimie de surface pour l'immobilisation de l'FA à la surface d'or du prisme. Cette optimisation est importante pour

identifier les espaceurs moléculaires nécessaires à la liaison covalente de l'FA. Ces espaceurs doivent minimiser l'adsorption non-spécifique de l'enzyme et des molécules à cribler avec la surface d'or pour ne pas biaiser les valeurs de K_d obtenues. Pour l'approche A, cette étape avait été résolue grâce à une étude intensive identifiant une chimie de surface offrant peu d'interactions non spécifiques pour l'immobilisation d'enzymes avec queue de polyhistidines [12].

Il faut noter que cette approche nécessite d'utiliser l'enzyme DHFR R67 sans queue de polyhistidines afin de diminuer les interactions non-spécifiques entre les charges positives du motif polyhistidine et les carboxylates de l'FA immobilisé à la surface. Ces interactions non-spécifiques pourraient contribuer à générer de faux signaux positifs. De plus, il est attendu que les inhibiteurs potentiels forment des interactions de types ponts H avec le site actif de l'enzyme, similairement au NADPH et DHF. Ainsi, une affinité plus élevée serait requise pour les molécules criblées afin de déloger l'enzyme de la surface par des interactions de type pont H si l'enzyme forme des interactions non-spécifiques électrostatiques, plus fortes que des ponts H.

3.3.2. Partie expérimentale

Préparation et fonctionnalisation des prismes d'or

Les prismes recouverts d'or ont été conçus en déposant un mince film d'or sur des prismes de verre de 20×12×3 mm selon la procédure décrite dans la partie expérimentale de l'approche A (section 3.2.2).

Pour l'approche B, deux différents espaceurs moléculaires ont été testés de manière à obtenir l'FA immobilisé de manière covalente à la surface des prismes d'or (Figure 3-26) selon les réactions de fonctionnalisation résumées à la Figure 3-27.

En particulier, la fonctionnalisation covalente de la surface d'or par l'FA passe par un couplage EDC/NHS des amides de la SAM de 4-ATP (réaction 1, Figure 3-27) avec les acides carboxyliques de l'FA selon une procédure établie [35], ou par la formation de lien covalent Au-S avec le groupement thiol de l'FA-PEG-SH.

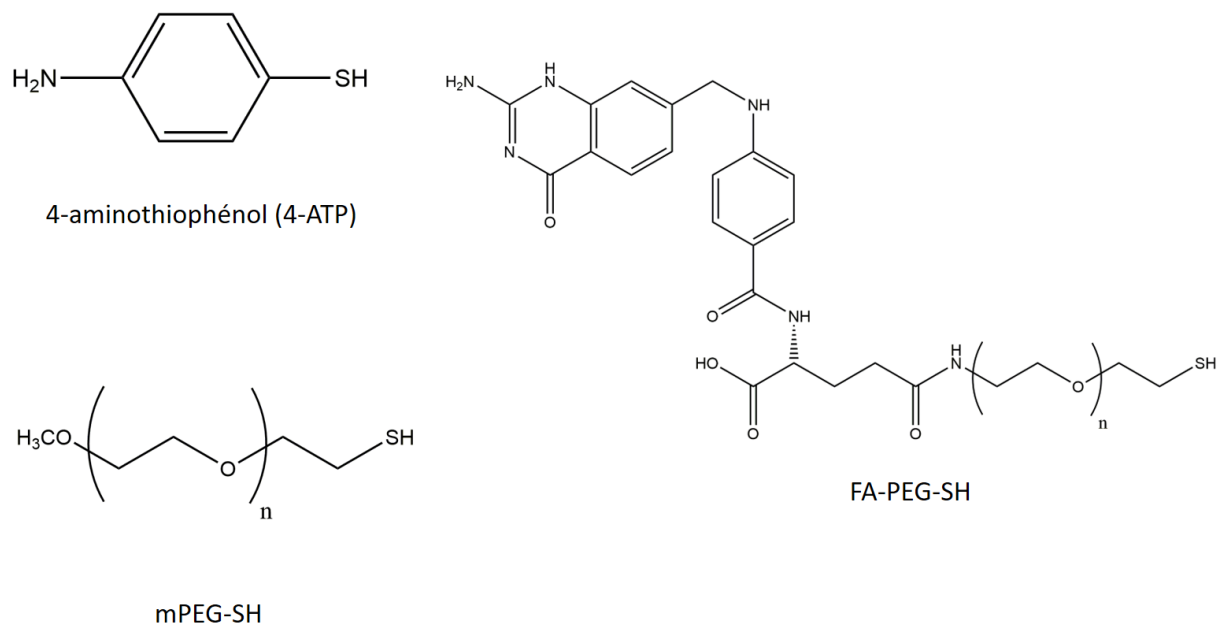


Figure 3-26 Structures des espaceurs moléculaires utilisés pour fonctionnaliser la surface des prismes d'or

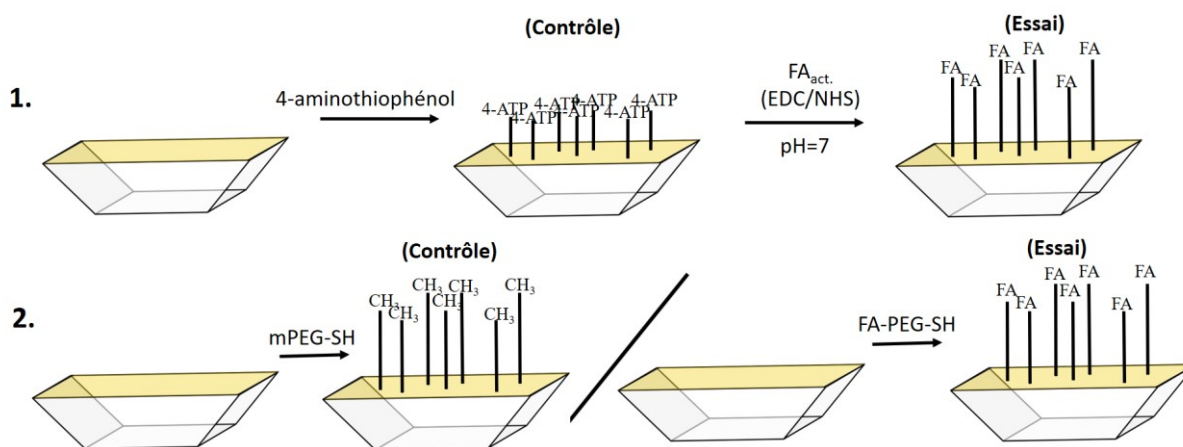


Figure 3-27 Compilation des chimies de surface testées dans le but de lier l'FA de façon covalente à la surface du prisme d'or pour l'approche B.

Le 4-aminothiophénol (4-ATP) (réaction 1) et le PEG-SH (réaction 2) servent d'espaceur moléculaire afin de lier l'FA de manière covalente à la surface d'or. Définitions : FA-PEG-SH : acide folique poly(éthylène)glycol thiol, mPEG-SH : méthoxy poly(éthylène)glycol thiol.

Montage et conditions des expériences SPR

Les expériences de biodétection de la DHFR R67 furent entreprises dans un appareil P4SPR portatif (Affinité Instruments, Figure 3-28) tel que publié[2].

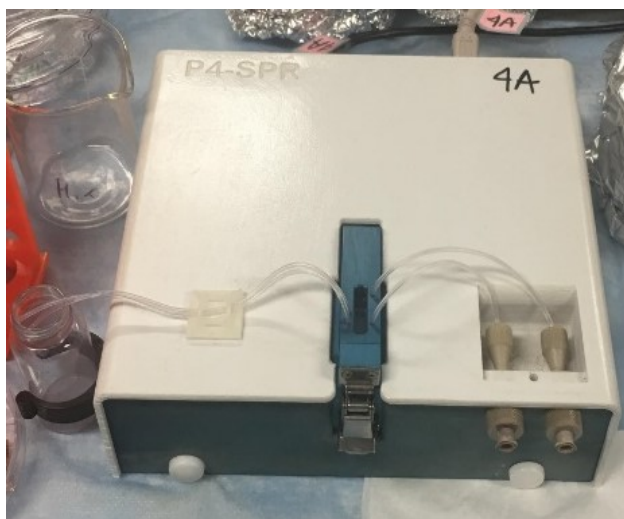


Figure 3-28 Appareil portatif P4SPR utilisée pour les mesures en SPR

Les expériences de biodétection en SPR ont été faites en mesurant d'abord la ligne de base pendant 2 min par l'injection de 10 fois le volume de la cellule (1 mL) avec du tampon KPO_4 50 mM pH=7, suivi d'une injection de 100 μg DHFR R67 (sans queue de polyhistidines). Suivi un rinçage de 2×1 mL de tampon KPO_4 pendant 2 min. Des échantillons préincubés au préalable pendant 20 min avec 100 μg d'enzyme avec six différentes concentrations de FA (0, 100, 200, 400, 800, 1600 μM) ont été injectés en tant que réplicats. Tel que vu à la section «Introduction», l'injection de molécules à différentes concentrations a pour objectif de tracer une courbe d'étalonnage permettant d'obtenir la constante K_d essentielle pour évaluer l'affinité des molécules à la DHFR R67. L'étape de préincubation de l'enzyme avec l'FA vise à s'assurer que l'FA ait le temps d'occuper le site actif de l'enzyme avant que ces dernières n'entrent en compétition avec les FA immobilisées à la surface d'or. Les expériences de contrôle ont été faites en injectant 100 μg d'enzyme sans FA. Puis, la liaison de l'enzyme à la surface fonctionnalisée a été mesurée pendant 20 min. Les déplacements de la longueur d'onde SPR ont été calculés en utilisant la différence entre les valeurs collectées après la dernière étape de lavage de la surface et les valeurs collectées avant l'injection d'échantillon d'enzyme seulement (référence) ou d'enzyme préincubée avec l'FA.

3.3.3. Résultats et discussion

L'approche B consiste à cribler les inhibiteurs potentiels sur prismes d'or fonctionnalisés à l'FA. Nous avons testé l'approche en utilisant les prismes fonctionnalisés à l'aide de l'espaceur 4-aminothiophénol (4-ATP) (réaction 1, Figure 3-27). Des résultats inattendus ont été obtenus (Figure 3-29). Premièrement, la DHFR R67 s'est liée avec autant d'affinité à la surface 4-ATP qu'avec celle couplée à l'FA. De plus, la préincubation de l'enzyme avec l'FA libre aurait dû réduire la liaison observée, mais ce ne fut pas le cas. Il semble n'y avoir aucune interaction spécifique de l'enzyme à ce type de surface.

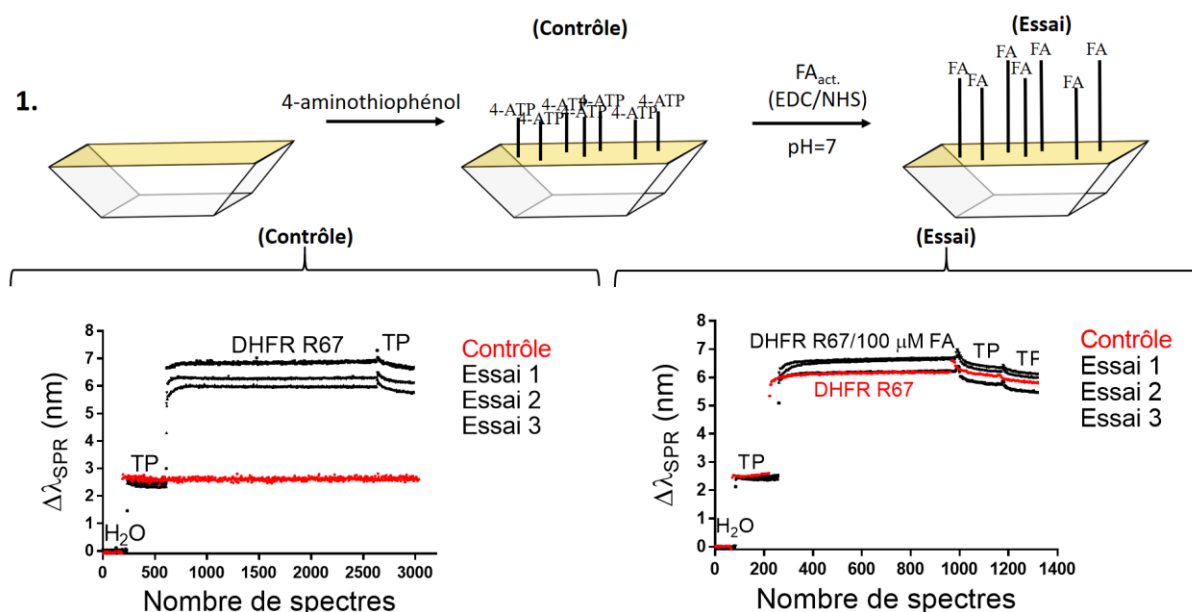


Figure 3-29 Tests SPR en utilisant des FA-(4-ATP)@prismes

Compétition selon l'approche B en utilisant (à gauche) un 4-ATP@prisme comme surface contrôle et un FA-(4-ATP)@prisme comme surface d'essai. Contrôle: $\Delta\lambda_{SPR}(TP, \text{contrôle}) = 2.43 \pm 0.08 \text{ nm}$; $\Delta\lambda_{SPR}(DHFR \text{ R67}, \text{essais}) = 3.7 \pm 0.4 \text{ nm}$; $n=3$. Essai: $\Delta\lambda_{SPR}(TP, \text{contrôle}) = 2.42 \pm 0.09 \text{ nm}$ ($n=3$); $\Delta\lambda_{SPR}(R67, \text{contrôle}) = 3.2 \text{ nm}$ ($n=1$); $\Delta\lambda_{SPR}(DHFR \text{ R67}, \text{Essais}) = 3.4 \pm 0.4 \text{ nm}$ ($n=3$). Définitions: TP: tampon KPO_4 50 mM pH=7.

Il est probable que l'immobilisation de l'FA à la surface d'or n'ait pas réussi, bien que la réaction de couplage au EDC/NHS soit simple et efficace [36-37]. Une caractérisation supplémentaire telle qu'une mesure de spectre FTIR aurait été requise pour vérifier ce résultat. En revanche, si la surface est effectivement fonctionnalisée avec l'FA, comment expliquer que l'FA libre ne puisse pas rivaliser avec l'FA immobilisée en surface pour le site actif de l'enzyme? Si la compétition avait effectivement eu lieu sur une telle surface, alors le signal SPR obtenu aurait l'allure du signal prévu tel qu'illustré à la Figure 3-25.

Une explication possible concerne le site de liaison symétrique de la DHFR R67, qui lie deux molécules d'FA à la fois. Le deuxième événement de liaison de l'FA à l'enzyme est de plus forte affinité que le premier (coopérativité positive): $K_{d1} = 120 \pm 15 \mu\text{M}$ et $K_{d2} = 36 \pm 4 \mu\text{M}$ [15]. Or, 100 μM de FA libre a été utilisé pour traiter la DHFR R67. Afin de vérifier si cette concentration d'FA libre suffit, nous proposons éventuellement de pré-incuber l'enzyme avec une gamme de concentrations choisies en fonction du K_{d1} pour permettre au moins au premier événement de liaison de l'FA à l'enzyme de se produire.

Ces différentes concentrations de FA choisies permettraient de confirmer l'hypothèse que la coopérativité positive de liaison de l'FA nuise à la compétition désirée entre les FA libres et les FA immobilisées. Faire varier les concentrations permettraient possiblement d'éviter que les résultats SPR inattendus obtenus jusqu'à présent pour l'approche B ne se reproduisent dû à une quantité insuffisante d'FA libre pré-incubée avec l'enzyme.

La deuxième méthode tentée pour immobiliser l'FA à la surface des prismes fut une fonctionnalisation à une seule étape (réaction 2, Figure 3-27). Les molécules mPEG-SH et FA-PEG-SH furent utilisées afin de générer respectivement une surface contrôle ainsi que la surface d'intérêt respectivement.

Des tests de saturation de la surface des prismes d'or avec une solution de mPEG-SH ou FA-PEG-SH dans du tampon KPO_4 furent entrepris afin de maximiser l'immobilisation de FA pour offrir une compétition efficace selon l'approche B. Aucune augmentation significative du signal SPR ($\Delta\lambda_{\text{SPR}} < 1 \text{ nm}$) ne fut observée en fonction de la concentration de mPEG-SH ou bien de FA-PEG-SH injectée, entre 200 μM et 800 μM (Figure 3-30). Par conséquent, 800 μM fut la concentration adoptée pour les réactions de fonctionnalisation la surface des prismes d'or testées à la Figure 3-27.

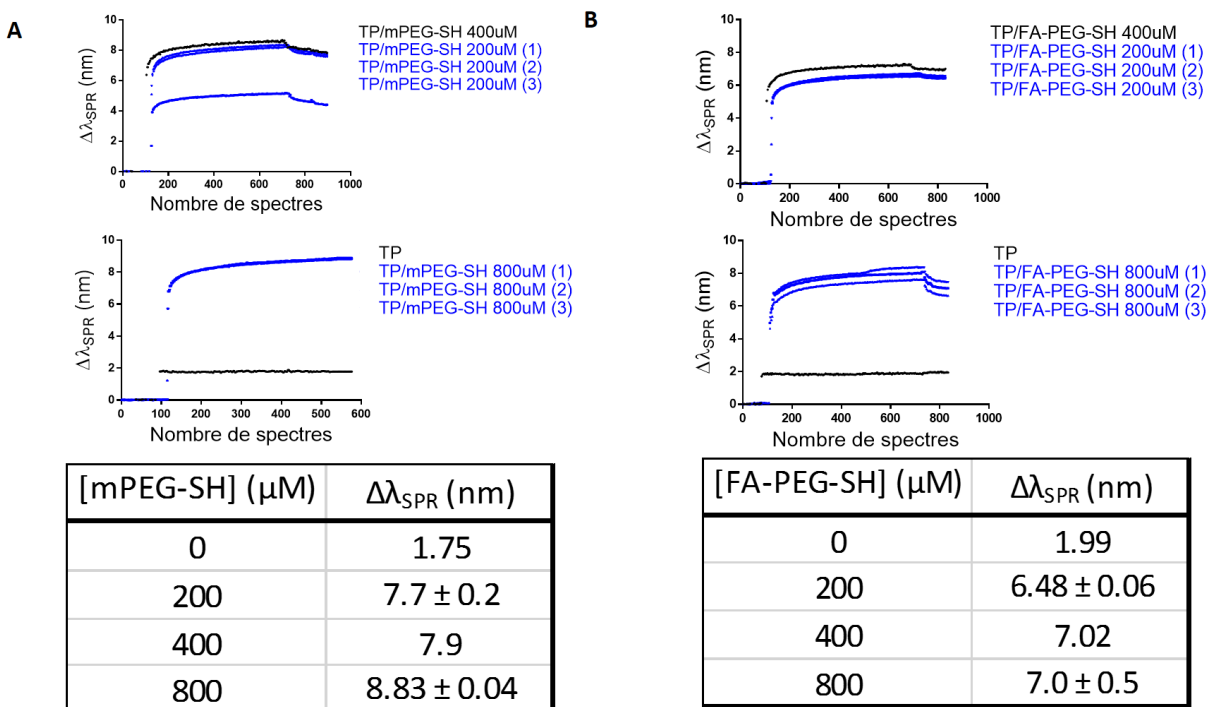


Figure 3-30 Tests de saturation de la surface des prismes d'or

Sensogrammes et les déplacements SPR correspondants à l'injection de solutions de (A) mPEG-SH ou (B) FA-PEG-SH sur une surface d'or vierge.

L'Équation 3-2 suivante, permet de convertir l'épaisseur d'une surface de matériel pur en densité d'une SAM, donc le taux de recouvrement de la surface d'or [38] :

$$n = \frac{N_A \times \rho_{PEG} \times \Gamma_{org}}{M_W}$$

Équation 3-2 Calcul de la quantité de molécules PEG immobilisées à la surface d'un prisme d'or

où n représente le nombre de molécules thiolées (nm^2), N_A le nombre d'Avogadro ($6.02 \times 10^{23} \text{ mol}^{-1}$), ρ_{PEG} correspond à la densité de la monocouche PEG ($\sim 1.1 \text{ g/cm}^3$), Γ_{org} l'épaisseur de la couche organique substituée pour l'épaisseur de la couche d'or dans ce cas-ci (50 nm) puis M_W la masse molaire de la molécule thiolée (g/mol). Si l'on approxime que $\rho_{PEG} \approx \rho_{mPEG-SH} \approx \rho_{FA-PEG-SH}$, puis sachant que l'aire de la surface contenue dans un canal de l'instrument *P4SPR* est d'environ 10 mm^2 et que le mPEG-SH (Nanocs) et l'FA-PEG-SH (Biochempeg) ont respectivement une masse molaire de 2 000 g/mol et 1 000 g/mol, chacun des canaux contient $\sim 36 \times 10^{13}$ et 18×10^{13} molécules PEG-SH immobilisées pour une surface de prisme

fonctionnalisée au mPEG-SH ou à l'FA-PEG-SH respectivement. Ainsi, ces tests relèvent la présence de l'FA pour procéder à un criblage selon l'approche B.

Les résultats présentés la Figure 3-30 confirment le succès de l'immobilisation de ces deux molécules sur les prismes d'or. Tel que proposé ci-dessus, diverses concentrations d'FA libre furent testées pour la pré-incubation avec l'enzyme, près de et au-dessus du K_{d1} de l'FA pour la liaison à la DHFR R67.

Les résultats obtenus furent étonnants (Figure 3-31 et Figure 3-32). D'abord, les déplacements SPR induits par la liaison de l'enzyme aux FA-PEG-SH@prismes (Figure 3-32) sont plus élevés que ceux induits pour les mPEG-SH@prismes (Figure 3-31). Cela démontre des interactions spécifiques avec le site actif de la DHFR R67 pour les prismes à l'FA-PEG-SH.

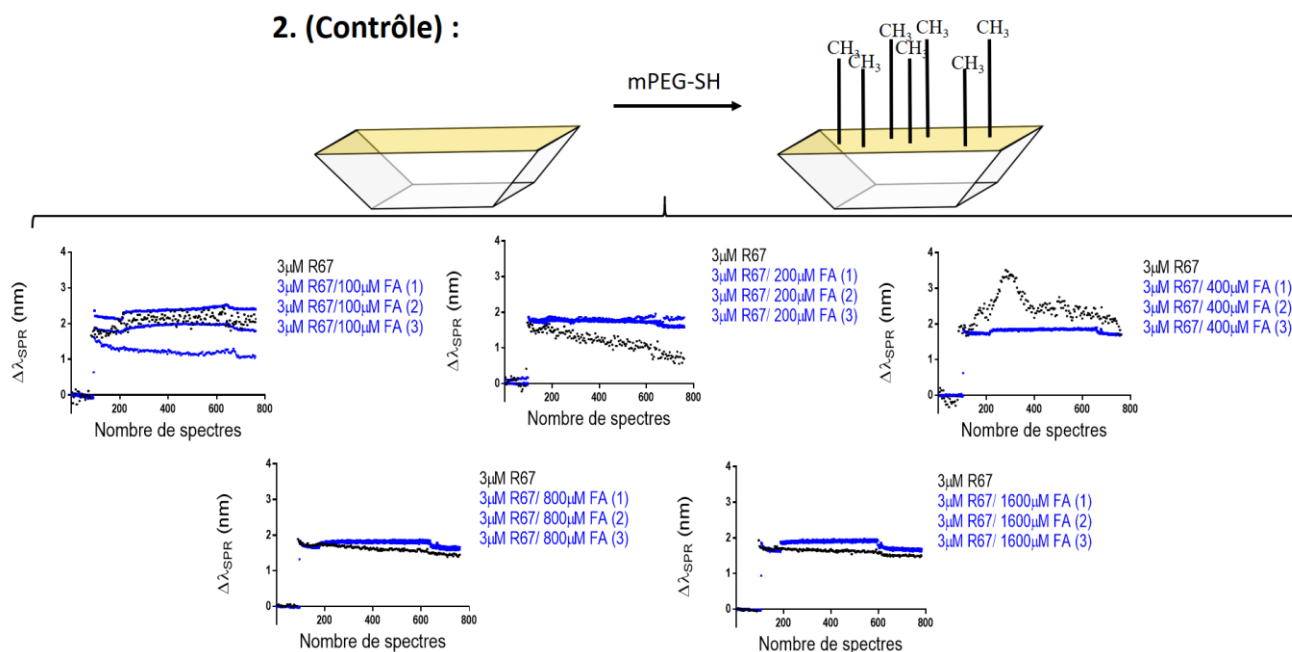


Figure 3-31 Tests SPR en utilisant des mPEG-SH@prismes

Vérification des interactions non-spécifiques entre la DHFR R67 libre et l'FA immobilisée. Compétition selon l'approche B en utilisant un mPEG-SH@prisme comme contrôle.

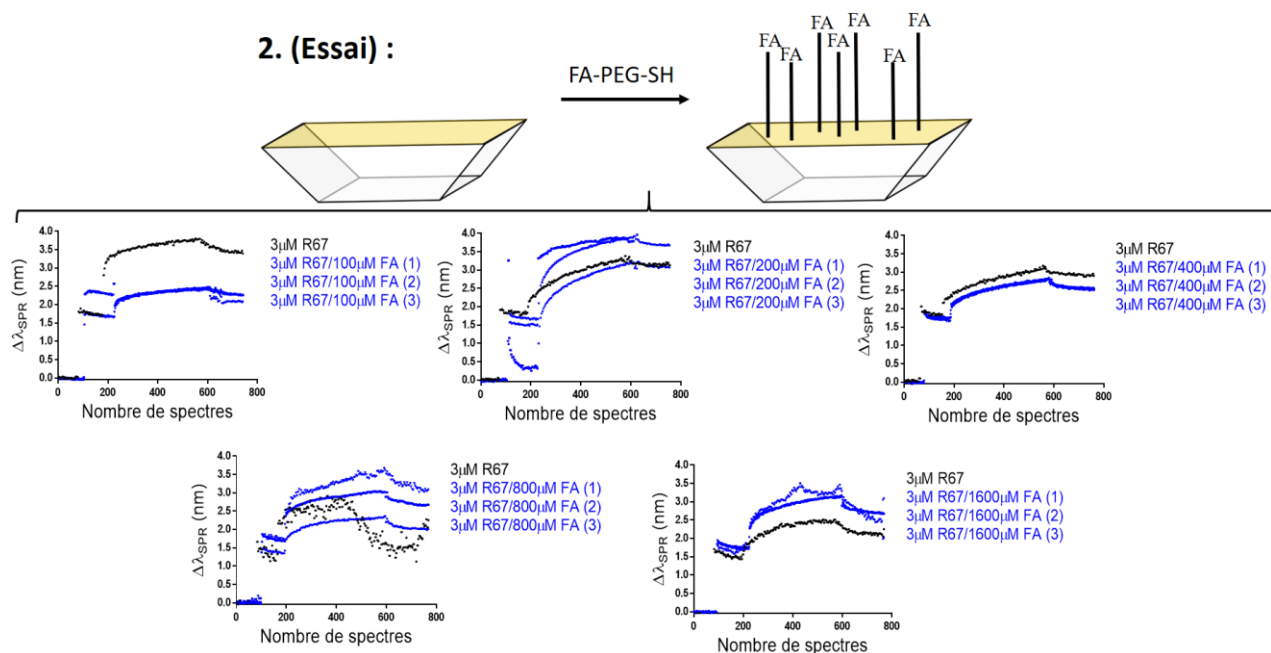


Figure 3-32 Tests SPR en utilisant des FA-PEG-SH@prismes

Vérification des interactions spécifiques entre la DHFR R67 libre et l'FA immobilisée. Compétition selon l'approche B en utilisant un FA-PEG-SH@prisme comme essai.

Toutefois, il n'y a pas de tendance du signal SPR des réplicats par rapport à la référence lorsque la concentration d'FA pré-incubée augmente (Figure 3-32). En effet, on s'attendrait à une diminution du signal alors que la concentration d'FA libre augmente car moins d'enzyme libre serait disponible pour lier l'FA immobilisée sur les prismes, tel qu'illustré à la Figure 3-25. L'absence d'une telle tendance, alors que nos résultats suggérant qu'il y a effectivement des interactions spécifiques qui se produisent dans ce système, démontre la complexité de la compétition recherchée avec l'enzyme DHFR R67.

En effet, il se pourrait que la coopérativité positive de liaison de l'FA à la DHFR R67 complexifie le signal attendu pour l'approche B comme dans l'approche A. En effet, il est possible qu'il y ait (1) une coopérativité positive de liaison à l'enzyme entre les FA libre en solution seulement et/ou (2) une coopérativité positive de liaison entre le mélange de FA libre/FA immobilisé sur le prisme. Par conséquent, cela résulterait en des signaux SPR non proportionnels ou non cohérents avec l'augmentation de la concentration du 2^e compétiteur (FA libre) tel qu'attendu à la Figure 3-25.

3.3.4. Conclusion

Pour l'approche B, une variété d'analyses SPR fut accomplie afin de développer une plateforme de criblage basée sur un signal SPR généré exclusivement par une compétition des interactions FA_(immobilisée en surface)/Enzyme_(libre) et Inhibiteur_(libre)/Enzyme_(libre). Les résultats ont montré qu'il est possible d'immobiliser avec succès l'FA à la surface des prismes d'or et qu'il existe des interactions spécifiques de type FA_(immobilisée en surface)/Enzyme_(libre). Cependant, ces interactions spécifiques ne peuvent être contrôlées dans un système impliquant l'enzyme DHFR R67 où la coopérativité de liaison complique les signaux SPR obtenus. En effet, il n'était pas possible d'obtenir une tendance de signal SPR avec l'augmentation de concentration du second compétiteur (FA libre), une expérience essentielle pour extraire les informations clés au développement d'antibiotiques tel le K_d .

3.4. Références (Chapitre 3)

1. Bastien, D.; Ebert, M. C. C. J. C.; Forge, D.; Toulouse, J.; Kadnikova, N.; Perron, F.; Mayence, A.; Huang, T. L.; Vanden Eynde, J. J.; Pelletier, J. N., Fragment-Based Design of Symmetrical Bis-benzimidazoles as Selective Inhibitors of the Trimethoprim-Resistant, Type II R67 Dihydrofolate Reductase. *J Med Chem* **2012**, 55 (7), 3182-3192.
2. Zhao, S. S.; Bukar, N.; Toulouse, J. L.; Pelechacz, D.; Robitaille, R.; Pelletier, J. N.; Masson, J.-F., Miniature multi-channel SPR instrument for methotrexate monitoring in clinical samples. *Biosens Bioelectron* **2015**, 64, 664-670.
3. Dostálek, J.; Ladd, J.; Jiang, S.; Homola, J., SPR Biosensors for Detection of Biological and Chemical Analytes. In *Surface Plasmon Resonance Based Sensors*, Springer: Berlin, Heidelberg, 2006; pp 177-190.
4. Adam, P.; Piliarik, M.; Šípová, H.; Špringer, T.; Vala, M.; Homola, J., Surface Plasmons for Biodetection. In *Photonic Sensing*, John Wiley & Sons: Hoboken, NJ, 2012; pp 1-58.
5. Guo, Y.; Ye, J. Y.; Divin, C.; Huang, B.; Thomas, T. P.; Baker, J. R.; Norris, T. B., Real-Time Biomolecular Binding Detection Using a Sensitive Photonic Crystal Biosensor. *Anal Chem* **2010**, 82 (12), 5211-5218.
6. Zhao, S. S.; Bichelberger, M. A.; Colin, D. Y.; Robitaille, R.; Pelletier, J. N.; Masson, J.-F., Monitoring methotrexate in clinical samples from cancer patients during chemotherapy with a LSPR-based competitive sensor. *Analyst* **2012**, 137 (20), 4742-4750.
7. Saha, K.; Agasti, S. S.; Kim, C.; Li, X.; Rotello, V. M., Gold Nanoparticles in Chemical and Biological Sensing. *Chem Rev* **2012**, 112 (5), 2739-2779.
8. Haiss, W.; Thanh, N. T. K.; Aveyard, J.; Fernig, D. G., Determination of Size and Concentration of Gold Nanoparticles from UV-Vis Spectra. *Anal Chem* **2007**, 79 (11), 4215-4221.

9. Chen, H.; Kou, X.; Yang, Z.; Ni, W.; Wang, J., Shape- and Size-Dependent Refractive Index Sensitivity of Gold Nanoparticles. *Langmuir* **2008**, *24* (10), 5233-5237.
10. Aubé, A.; Breault-Turcot, J.; Chaurand, P.; Pelletier, J. N.; Masson, J.-F., Non-specific Adsorption of Crude Cell Lysate on Surface Plasmon Resonance Sensors. *Langmuir* **2013**, *29* (32), 10141-10148.
11. Bolduc, O. R.; Clouthier, C. M.; Pelletier, J. N.; Masson, J.-F., Peptide Self-Assembled Monolayers for Label-Free and Unamplified Surface Plasmon Resonance Biosensing in Crude Cell Lysate. *Anal Chem* **2009**, *81* (16), 6779-6788.
12. Bolduc, O. R.; Lambert-Lanteigne, P.; Colin, D. Y.; Zhao, S. S.; Proulx, C.; Boeglin, D.; Lubell, W. D.; Pelletier, J. N.; Fethiere, J.; Ong, H.; Masson, J.-F., Modified peptide monolayer binding His-tagged biomolecules for small ligand screening with SPR biosensors. *Analyst* **2011**, *136* (15), 3142-3148.
13. Jung, L. S.; Campbell, C. T.; Chinowsky, T. M.; Mar, M. N.; Yee, S. S., Quantitative Interpretation of the Response of Surface Plasmon Resonance Sensors to Adsorbed Films. *Langmuir* **1998**, *14* (19), 5636-5648.
14. Bolduc, O. R.; Clouthier, C. M.; Pelletier, J. N.; Masson, J. F., Peptide self-assembled monolayers for label-free and unamplified surface plasmon resonance biosensing in crude cell lysate. *Anal Chem* **2009**, *81* (16), 6779-6788.
15. Jackson, M.; Chopra, S.; Smiley, R. D.; Maynard, P. O. N.; Rosowsky, A.; London, R. E.; Levy, L.; Kalman, T. I.; Howell, E. E., Calorimetric Studies of Ligand Binding in R67 Dihydrofolate Reductase. *Biochemistry* **2005**, *44* (37), 12420-12433.
16. Vauquelin, G.; Charlton, S. J., Exploring avidity: understanding the potential gains in functional affinity and target residence time of bivalent and heterobivalent ligands. *Brit J Pharmacol* **2013**, *168* (8), 1771-1785.
17. Huang, P.; Bao, L.; Zhang, C.; Lin, J.; Luo, T.; Yang, D.; He, M.; Li, Z.; Gao, G.; Gao, B.; Fu, S.; Cui, D., Folic acid-conjugated Silica-modified gold nanorods for X-ray/CT imaging-guided dual-mode radiation and photo-thermal therapy. *Biomaterials* **2011**, *32* (36), 9796-9809.
18. Pasternack, R. M.; Rivillon Amy, S.; Chabal, Y. J., Attachment of 3-(Aminopropyl)triethoxysilane on Silicon Oxide Surfaces: Dependence on Solution Temperature. *Langmuir* **2008**, *24* (22), 12963-12971.
19. Wang, S.; Lee, R. J.; Mathias, C. J.; Green, M. A.; Low, P. S., Synthesis, Purification, and Tumor Cell Uptake of ⁶⁷Ga-Deferoxamine-Folate, a Potential Radiopharmaceutical for Tumor Imaging. *Bioconjug Chem* **1996**, *7* (1), 56-62.
20. Nakajima, N.; Ikada, Y., Mechanism of Amide Formation by Carbodiimide for Bioconjugation in Aqueous Media. *Bioconjug Chem* **1995**, *6* (1), 123-130.
21. Duff, M. R.; Chopra, S.; Strader, M. B.; Agarwal, P. K.; Howell, E. E., Tales of Dihydrofolate Binding to R67 Dihydrofolate Reductase. *Biochemistry* **2016**, *55* (1), 133-145.
22. Zhou, J.; Ralston, J.; Sedev, R.; Beattie, D. A., Functionalized gold nanoparticles: synthesis, structure and colloid stability. *J Colloid Interface Sci* **2009**, *331* (2), 251-262.
23. Yu, M.; Zhou, C.; Liu, J.; Hankins, J. D.; Zheng, J., Luminescent Gold Nanoparticles with pH-Dependent Membrane Adsorption. *J Am Chem Soc* **2011**, *133* (29), 11014-11017.
24. International Union of, P.; Applied, C.; Commission on Equilibrium, D.; Serjeant, E. P.; Dempsey, B.; International Union of, P.; Applied, C.; Commission on Electrochemical, D., Tables. In *Ionisation constants of organic acids in aqueous solution*, Pergamon Press: Oxford; New York, 1979; pp 9-766.

25. Newman, J. D. S.; Blanchard, G. J., Formation and encapsulation of gold nanoparticles using a polymeric amine reducing agent. *J Nanopart Res* **2007**, 9 (5), 861-868.
26. Shakeri-zadeh, A.; Eshghi, H.; Mansoori, G. A.; Hashemian, A. R., Gold Nanoparticles Conjugated with Folic Acid using Mercaptohexanol as the linker. *J Nanotech Prog Int* **2009**.
27. Neises, B.; Steglich, W., Simple Method for the Esterification of Carboxylic Acids. *Angew Chem Int Edit* **1978**, 17 (7), 522-524.
28. Shakeri-Zadeh, A.; Ghasemifard, M.; Ali Mansoori, G., Structural and optical characterization of folate-conjugated gold-nanoparticles. *Physica E* **2010**, 42 (5), 1272-1280.
29. Warner, M. G.; Reed, S. M.; Hutchison, J. E., Small, Water-Soluble, Ligand-Stabilized Gold Nanoparticles Synthesized by Interfacial Ligand Exchange Reactions. *Chem Mater* **2000**, 12 (11), 3316-3320.
30. Ben Haddada, M.; Blanchard, J.; Casale, S.; Krafft, J.-M.; Vallée, A.; Méthivier, C.; Boujday, S., Optimizing the immobilization of gold nanoparticles on functionalized silicon surfaces: amine- vs thiol-terminated silane. *Gold Bull* **2013**, 46 (4), 335-341.
31. Ross, R. D.; Roeder, R. K., Binding affinity of surface functionalized gold nanoparticles to hydroxyapatite. *J Biomed Mater Res A* **2011**, 99A (1), 58-66.
32. Pamies, R.; Cifre, J. G. H.; Espín, V. F.; Collado-González, M.; Baños, F. G. D.; de la Torre, J. G., Aggregation behaviour of gold nanoparticles in saline aqueous media. *J Nanopart Res* **2014**, 16 (4), 2376.
33. Liu, X.; Atwater, M.; Wang, J.; Huo, Q., Extinction coefficient of gold nanoparticles with different sizes and different capping ligands. *Colloids Surf B Biointerfaces* **2007**, 58 (1), 3-7.
34. Pires, N. M. M.; Dong, T.; Hanke, U.; Hoivik, N., Recent Developments in Optical Detection Technologies in Lab-on-a-Chip Devices for Biosensing Applications. *Sensors* **2014**, 14 (8), 15458-15479.
35. Sohn, Y.-S.; Lee, Y. K., Site-directed immobilization of antibody using EDC-NHS-activated protein A on a bimetallic-based surface plasmon resonance chip. *J Biomed Opt* **2014**, 19 (5), 051209-051209.
36. Ciulli, A., Biophysical Screening for the Discovery of Small-Molecule Ligands. In *Protein-Ligand Interactions: Methods and Applications*, Humana Press: Totowa, NJ, 2013; pp 357-388.
37. Fischer, M. J. E., Amine Coupling Through EDC/NHS: A Practical Approach. In *Surface Plasmon Resonance: Methods and Protocols*, Humana Press: Totowa, NJ, 2010; pp 55-73.
38. Ray, S.; Steven, R. T.; Green, F. M.; Höök, F.; Taskinen, B.; Hytönen, V. P.; Shard, A. G., Neutralized Chimeric Avidin Binding at a Reference Biosensor Surface. *Langmuir* **2015**, 31 (6), 1921-1930.

Chapitre 4 - Conclusion

générale et perspectives

4.1. Retour sur les objectifs et résultats du projet

En conclusion générale, le but du projet consistait à développer une méthode de criblage en SPR pour la caractérisation d'inhibiteurs de l'enzyme DHFR R67. La SPR s'avère une méthode analytique puissante pour une telle application puisqu'elle permet d'obtenir rapidement des informations sur la liaison entre une cible protéique et son ligand (K_a , K_d , k_{on} , k_{off} , n). De plus, c'est une méthode versatile pouvant être appliquée à presque tout type de protéine et elle ne nécessite pas le marquage de la protéine étudiée.

Le chapitre 2 décrivait l'établissement des conditions à utiliser pour le développement d'une plateforme de criblage pour la DHFR R67 ainsi que pour la hDHFR (comme enzyme contrôle pour le développement d'inhibiteur sélectifs à la DHFR R67). Plus précisément, l'objectif de l'étude consistait à identifier le co-solvant optimal afin d'assurer une bonne solubilité des inhibiteurs potentiels ainsi qu'un maintien de l'activité enzymatique. Les résultats du chapitre 2 ont montré que 10% de DMSO, 10% DMF ou 10% MeOH furent les trois meilleures conditions pour un criblage d'inhibiteurs impliquant la DHFR R67 comme cible ainsi que la hDHFR comme enzyme contrôle. Par conséquent, 10% DMSO fut la condition de co-solvant utilisée au chapitre 3.

Le chapitre 3 décrivait deux approches qui ont été considérées pour le développement de la plateforme de criblage de l'enzyme DHFR R67 en SPR. L'une des deux approches implique des FA@AuNPs en tant qu'amplificateur de signaux SPR (approche A) et l'autre en absence de FA@AuNPs (approche B).

Pour l'approche A, les résultats ont démontré l'existence d'interactions non spécifiques importantes entre les FA:AuNPs (fonctionnalisation non covalentes) et l'inhibiteur *DHFR34* testé lors d'expériences en LSPR. Ces interactions non spécifiques nuisent à l'application d'un criblage basé sur la compétition entre l'inhibiteur et les FA@AuNPs pour la DHFR R67. Comme solution, une fonctionnalisation covalente des AuNPs à l'FA a été considérée afin de stabiliser davantage la structure des FA@AuNPs pour éviter les interactions non-spécifiques. Les résultats ont effectivement montré qu'une fonctionnalisation covalente des AuNPs à l'FA (FA-AuNPs) comparée à une fonctionnalisation non covalente (FA:AuNPs) contribue à éliminer significativement les interactions non spécifiques de ces dernières avec l'inhibiteur

DHFR34. Cependant, lors de l'utilisation des FA-AuNPs dans l'essai de compétition en LSPR avec l'inhibiteur *DHFR34* en présence de l'enzyme DHFR R67, il n'était pas possible d'observer une liaison des FA-AuNPs à l'enzyme. En plus de l'absence du déplacement bathochromique λ_{LSPR} des FA-AuNPs attendu pour leurs liaisons à l'enzyme, cet absence de signal était toujours suivi d'un déplacement hypsochromique de la λ_{LSPR} des FA-AuNPs après l'ajout de l'inhibiteur. Toutes les expériences effectuées ont montré qu'il ne fut pas possible d'éliminer les interactions non spécifiques importantes entre les FA:AuNPs ou même FA-AuNPs et l'inhibiteur *DHFR34*. Le fait de n'avoir pu éliminer ces interactions non-spécifiques prévient le développement potentiel d'une plateforme de criblage de la DHFR R67 en SPR basée sur l'utilisation de FA@AuNPs. L'étude montre donc que l'approche A n'est donc pas une approche viable pour les objectifs recherchés.

Par conséquent, l'approche B constituait une solution aux interactions non spécifiques observées entre les FA@AuNPs et l'inhibiteur *DHFR34*. Dans cette deuxième approche, l'utilisation des FA@AuNPs est omise, ce qui simplifie la méthode au risque de diminuer la sensibilité de la méthode. Pour l'approche B, les résultats ont montré qu'il est possible d'obtenir des interactions spécifiques entre l'enzyme DHFR R67 et l'FA immobilisée sur un prisme d'or lorsque l'on a recours à une fonctionnalisation covalente à une étape (FA-PEG-SH). Les résultats furent plus encourageants. En effet, en utilisant une surface d'or modifiée à l'FA-PEG-SH, il était possible d'observer des interactions spécifiques importantes entre l'enzyme libre ainsi que l'FA immobilisée en surface. De plus, en comparant ces résultats à ceux d'une surface contrôle à base de mPEG-SH, il est possible de constater qu'il y a peu d'interactions non-spécifiques lorsque que le PEG-SH est utilisé comme espaceur moléculaire comparativement au 4-ATP. Cependant, il n'était pas possible d'observer une augmentation des interactions spécifiques avec l'augmentation de FA libre (agissant comme 2^e compétiteur). Le fait de ne pas obtenir une telle tendance prévient donc également l'utilisation de cette approche pour le développement d'une plateforme criblage de l'enzyme DHFR R67.

Les résultats des approches A et B suggèreraient que l'utilisation de l'FA dans les deux approches nuise au développement de la méthode. Il semblerait que la coopérativité positive de liaison de l'FA à la DHFR R67 complique effectivement les compétitions et événements de liaisons désirés. D'un autre point de vue, il est possible que cette coopérativité de liaison soit

essentielle afin de trouver d'autres inhibiteurs de la DHFR R67. Il est donc possible que le modèle d'une plateforme de criblage SPR basée sur l'approche A ou B ne soit tout simplement pas compatible avec cette enzyme dont les phénomènes de liaison sont particuliers.

4.2. Perspectives

Néanmoins, le projet pourrait être approfondi en faisant de la co-cristallisation entre les FA@AuNPs, l'inhibiteur *DHFR34* et la DHFR R67. En effet, il est possible de co-cristalliser des AuNPs avec des protéines [1]. La structure cristalline résultante permettrait de visualiser si l'enzyme peut lier simultanément l'FA à la surface des NPs et l'inhibiteur *DHFR34*. Cela permettrait de comprendre et de confirmer davantage les types d'interactions spécifiques entre les différents acteurs de l'essai compétitif recherché.

Pour l'approche A utilisant des AuNPs, les solutions à envisager pour le futur seraient d'identifier une chimie de surface permettant de lier spécifiquement le site actif de l'enzyme tout en empêchant les interactions non-spécifiques importantes entre les AuNPs modifiées et l'inhibiteur à cribler. Comme suggestion, on pourrait envisager les AuNPs modifiées avec le peptide 3-MPA-LHDLHD-OH, puisque ce peptide donne lieu à une chimie de surface réduisant de telles interactions non-spécifiques[2]. Une fois cela résolu, si la méthode de criblage est bien établie, il serait possible d'envisager de sélectionner d'autres inhibiteurs potentiels de la DHFR R67 pour la caractérisation de leur affinité pour l'enzyme, ce qui validerait davantage la méthode selon cette approche. Néanmoins, ce problème n'est pas simple : la symétrie du site actif de la DHFR R67 ayant pour conséquence qu'elle lie deux molécules de tout ligand, nous a laissés, jusqu'à présent, sans solution à ce problème. En effet, la symétrie du site actif pourrait impliquer les liaisons désirées de deux FA@AuNPs ou deux inhibiteurs *DHFR34* par site actif d'enzyme, mais également les liaisons non désirées d'une FA@AuNP et d'un inhibiteur *DHFR34* par site actif d'enzyme.

Il serait également intéressant de co-cristalliser l'enzyme DHFR R67 avec les FA-AuNPs ou FA:AuNPs sans l'inhibiteur. Cela permettrait de visualiser si les interactions entre la DHFR R67 et les FA-AuNPs sont similaires et spécifiques à celles entre la DHFR R67 et l'FA libre. Cette expérience permettrait d'en connaître davantage sur la facilité des FA-AuNPs ou FA:AuNPs à pouvoir lier l'enzyme.

Pour l'approche B, il serait également intéressant de refaire les expériences, cependant en utilisant un mélange de FA-PEG-SH et de mPEG-SH à la surface des prismes d'or. Cela permettrait de réduire le recouvrement de la surface en FA, ce qui diminuerait l'encombrement stérique entre les FA immobilisées. Cela pourrait favoriser les interactions entre les FA immobilisées et l'enzyme libre.

Il serait aussi intéressant de changer l'FA par un ligand de la DHFR R67 dont la coopérativité de liaison est négative. Le NADPH est une molécule dont le deuxième événement de liaison moins fort que le premier. Il faudrait donc immobiliser le NADPH à la surface de AuNPs ou à la surface d'or d'un prisme. Or, le NADPH est dispendieux et instable, et donc il ne constitue pas une alternative viable à l'utilisation de l'FA. Il serait donc plus intéressant d'essayer un inhibiteur différent de *DHFR34* ayant une coopérativité négative afin de voir si les méthodes A et B peuvent fonctionner.

Ainsi, il ne fut pas possible de développer une plateforme de criblage de l'enzyme DHFR R67 étant donné les difficultés rencontrées dans les deux approches envisagées. Ces difficultés n'étaient pourtant pas rencontrées en utilisant la hDHFR dans une approche similaire à l'approche A pour une compétition impliquant des FA:AuNPs et le MTX[3]. La hDHFR présente une structure monomérique dont le site actif est plus petit et moins accessible comparé à la DHFR R67. Cela contribue à augmenter la sélectivité du site pour les molécules à lier dans le cas de la hDHFR comparé à la DHFR R67. Ainsi, il semblerait que le fait d'utiliser une enzyme tétramérique dont les dynamiques de liaisons sont complexes (coopérativité de liaison de molécules) ajoute à la complexité de la compétition recherchée pour le succès du projet. En effet, le fait que l'enzyme existe en équilibre entre sa forme tétramérique active et sa forme dimérique ajoute à la complexité des événements de liaison entre l'enzyme et les compétiteurs (nanoparticules et inhibiteur). Par conséquent, une alternative possible pour réduire la complexité de l'enzyme cible serait d'utiliser une enzyme dimérique, c'est-à-dire une enzyme où les monomères sont tous connectés de manière covalente.

Néanmoins, la SPR demeure en général une technique analytique intéressante à explorer pour le criblage d'inhibiteurs de cibles enzymatiques. Les efforts investis dans un tel projet peuvent réduire le temps consacré au criblage d'inhibiteurs, qui est l'étape initiale importante pour le développement de nouveaux médicaments tels les antibiotiques. Cette plateforme de

criblage basée sur les approches A et B explorées pourrait donc être appliquée à des cibles autres que la DHFR R67, ce qui pourrait rendre la méthode versatile et utile pour la caractérisation de nouveaux inhibiteurs de cibles variées.

4.3. Référence

1. Ribeiro, D.; Kulakova, A.; Quaresma, P.; Pereira, E.; Bonifácio, C.; Romão, M. J.; Franco, R.; Carvalho, A. L., Use of Gold Nanoparticles as Additives in Protein Crystallization. *Cryst Growth Des* **2014**, *14* (1), 222-227.
2. Bolduc, O. R.; Lambert-Lanteigne, P.; Colin, D. Y.; Zhao, S. S.; Proulx, C.; Boeglin, D.; Lubell, W. D.; Pelletier, J. N.; Fethiere, J.; Ong, H.; Masson, J.-F., Modified peptide monolayer binding His-tagged biomolecules for small ligand screening with SPR biosensors. *Analyst* **2011**, *136* (15), 3142-3148.
3. Zhao, S. S.; Bukar, N.; Toulouse, J. L.; Pelechacz, D.; Robitaille, R.; Pelletier, J. N.; Masson, J.-F., Miniature multi-channel SPR instrument for methotrexate monitoring in clinical samples. *Biosens Bioelectron* **2015**, *64*, 664-670.

Annexe

Section A – Résultats supplémentaires du Chapitre 2

I. Activity tests of R67 DHFR and hDHFR using PEG as a cosolvent

In order to verify that the increase of activity is truly due to the reagents or enzyme becoming more concentrated at Figure 2-4, we tested the activity of both enzymes in the presence of 0-40% (v/v) PEG 400. R67 DHFR did show increasing enzymatic activity between 0-20% PEG 400, lending support to the hypothesis of increased reagent concentration (Figure A- 1). PEG1000 also showed roughly the same effect. At 30-40% PEG 400, however, the activity of R67 DHFR decreased gradually, to reach the control value (100%); this may be the result of increased viscosity[1].

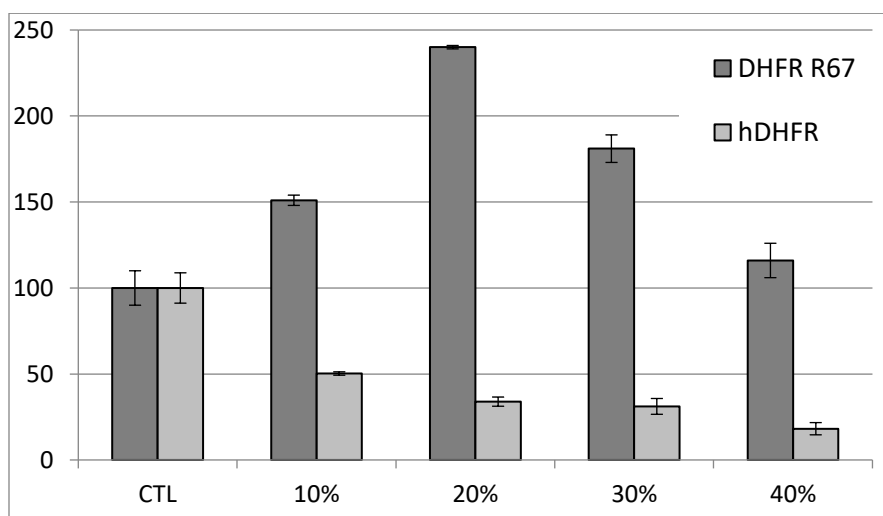


Figure A- 1 Initial rate of the enzymatic reaction for (■) R67 DHFR and (□) hDHFR in the presence of increasing concentrations of PEG 400 (% v/v)

Enzyme activity in the absence of PEG was the reference value. Values are given as the mean \pm standard deviation for the results of at least two independent experiments performed in triplicate.

Unfortunately, it appears that the monomeric hDHFR was inactivated in the presence of the increasing concentrations of PEG 400. Indeed, the effects of molecular crowders on enzyme activity are empirical. They are known to affect protein structure, folding, shape, conformational stability and binding of small molecules[1-2], any of which may be relevant to the observed loss of activity. The same trend was observed with PEG1000.

Thus, while the results obtained for R67 DHFR at 0-20% PEG support our hypothesis, the inclusion of an additional, extraneous molecule (PEG) in the system has resulted in complex

behaviour, the interpretation of which would require a more extensive study. For this reason, we prefer not to include those new results in the final manuscript. We have, however, toned down the concluding sentence of that section to: "This is consistent with at least part of the reduction in enzyme activity (from the expected 600-700% to the observed 200%) being due to decreased enzyme concentration in the aqueous phase."

Section B – Analyses de données du Chapitre 3 par Matlab®

I. Codes utilisés pour la recherche de λ_{SPR} (minpixhuntlr3.m)

```

1      %[mins,pixs,Y]=minpixhuntlr(A);
2      %A is the matrix of ratioed spectra
3      %mins is the wavelength minima of each spectrum
4      %pixs is the pixel minima of each spectrum
5      %Y is the section parabola from which the minima is determined
6
7      function [mins,pixs,Y]=minpixhuntlr2(A,lamda,start,stop);
8      %wavel=(1:1:1024).*0.3676+551.57)';
9      wavel = lamda(1:2001,:);
10     [m,n]=size(A);
11     count=1;
12     pixel=[1:1:2001]';
13     countr=1;
14     mins=[];
15     for i=1:1:n
16         [mn,indx]=min(A(:,i));
17         %[startp,endp]=fpnts(A(:,i),mn,indx);
18         startp = (start);
19         endp = (stop);
20         dip=A(startp:endp,i);
21         wavdip=pixel(startp:endp);
22         p=polyfit(wavdip,dip,2);
23         pp=polyder(p);
24         min1=roots(pp);
25         mins=[mins,min1];
26     end;
27     pixs=round(mins);
28     [m,n]=size(A);
29     Y=[];
30     for j=1:1:n
31         [mn,indx]=min(A(:,j));
32         %[stp,enp]=fpnts(A(:,j),mn,pixs(j));
33         stp = (start);
34         enp = (stop);
35         dip=A(stp:enp,j);
36         wavel=wavel(stp:enp);
37         p=polyfit(wavdip,dip,2);
38         ppv=polyval(p,wavdip);
39         pp=polyder(p);
40         Y=[Y;ppv];
41         mins(:,j)=roots(pp);
42         countr=countr+1;
43     end;
44
45     function [sp,ep]=fpnts(M,mn1,indx1)
46     p=mn1;
47     ep=indx1;
48     sp=indx1;
49     while p<1.02*mn1
50         p=M(ep);
51         ep=ep+1;
52     end;
53
54     p=mn1;
55     while p<1.02*mn1
56         p=M(sp);
57         sp=sp-1;
58     end;
59

```

Figure A- 2 Lignes de codes utilisées pour l'algorithme minpixhuntlr3.m dans Matlab

II. Commandes utilisées pour la recherche de λ_{SPR}

```

for i = 1:1:149;
bb=['cin',int2str((i-1)),'.txt'];
g = load(bb);
[cin(:,i)] = g(:,2);
end

*modifie le i pour origine*

for i = 1:1:9;
bb=['dark',int2str((i-1)),'.txt'];
g = load(bb);
[d(:,i)] = g(:,2);
dark = mean ((d)')';
end

load dark0.txt
wave = dark0 (:,1);

for i = 1:1:9;
bb=['ref',int2str((i-1)),'.txt'];
g = load(bb);
[d(:,i)] = g(:,2);
ref = mean ((d)')';
end

for i=1:1:149; rat_cin (:,i) = (cin(:,i)-dark)./(ref-dark);end
plot(rat_cin(1:3648,1));

*trouver les bornes..pixel*

minscin (1:149,1)=minpixhuntlr3(rat_cin(:,1:149),wave,1050,1800);

for i=1:1:149/10; zz (i,1) = mean (minscin ((i-1)*10+1:10*i,1)')';end

*moyenne mobile*

```

Figure A- 3 Lignes de commandes à entrer dans Matlab

Commandes à utiliser lors de l'application de l'algorithme minpixhuntlr3.m dans Matlab

Références (Annexe)

1. Kuznetsova, I.; Zaslavsky, B.; Breydo, L.; Turoverov, K.; Uversky, V., Beyond the Excluded Volume Effects: Mechanistic Complexity of the Crowded Milieu. *Molecules* **2015**, *20* (1), 1377.
2. Kuznetsova, I. M.; Turoverov, K. K.; Uversky, V. N., What Macromolecular Crowding Can Do to a Protein. *Int J Mol Sci* **2014**, *15* (12), 23090-23140.